

175414

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**YENİDOĞAN YOĞUN BAKIM ÜNİTESİNDE YATAN ÇOK
DÜŞÜK DOĞUM AĞIRLIKLİ BEBEKLERİN SEPSİS VE NEK
GELİŞİMİNİ ENGELLEMeye YÖNELİK ORAL
LAKTOFERRİN PROFİLAKSİSİ VE T-REGULATUAR
HÜCRELER ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. İlke MÜNGAN AKIN

**NEONATOLOJİ BİLİM DALI
NEONATOLOJİ YAN DAL UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. F. Begüm ATASAY

ANKARA

2011

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**YENİDOĞAN YOĞUN BAKIM ÜNİTESİNDE YATAN ÇOK
DÜŞÜK DOĞUM AĞIRLIKLIL BEBEKLERİN SEPSİS VE NEK
GELİŞİMİNİ ENGELLEMELİ YÖNELİK ORAL
LAKTOFERRİN PROFİLAKSİSİ VE T- REGULATUAR
HÜCRELER ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. İlke MÜNGAN AKIN

**NEONATOLOJİ BİLİM DALI
NEONATOLOJİ YAN DAL UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. F. Begüm ATASAY

**Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından 2010 yılında 10B3330011 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ANKARA

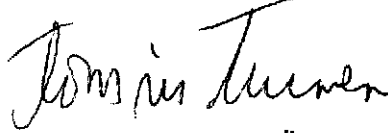
2011

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Tıpta Yandal Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütölmüş olan

“Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesinde Yatan Çok Düşük Doğum Ağırlıklı Bebeklerin Sepsis ve NEK Gelişimini Engellemeye Yönelik Oral Laktoferin Profilaksisi ve T-Regulatuar Hücreler Üzerine Etkisi” başlıklı Uzm. Dr. İlke Mungan Akın’a ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Tıpta Yandal Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 17 / 02 / 2011



Prof. Dr. Tomris TÜRMEŒ

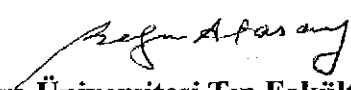
Ankara Üniversitesi Tıp Faköltesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı
Jüri Başkanı

Prof.Dr. Saadet ARSAN



Ankara Üniversitesi Tıp Faköltesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı
Neonatoloji Bilim Dalı
Üye

Doç. Dr. Begüm ATASAY



Ankara Üniversitesi Tıp Faköltesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı
Neonatoloji Bilim Dalı
Tez Danışmanı

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Yenidoğanda Sepsis.....	3
2.1.1. Tanım.....	3
2.1.2. Risk Faktörleri.....	4
2.1.2.1. Anneye Ait Faktörler.....	4
2.1.2.2. Bebeğe Ait Faktörler.....	5
2.1.2.3. Çevresel Faktörler.....	6
2.1.3. Etyopatoloji.....	6
2.1.4. Klinik Bulgular.....	7
2.1.5. Ayırıcı Tanı.....	10
2.1.6. Tanı.....	11
2.1.6.1. Lökosit Sayımı.....	11
2.1.6.2. Akut Faz Reaktanları.....	12
2.1.6.3. Birleşik Testler.....	13
2.1.7. Tedavi.....	13
2.1.7.1. Antibiyotik Tedavisi.....	14
2.1.7.2. Destek Tedavisi.....	15
2.1.8. Prognoz.....	16
2.1.9. Sepsisi Engelleyici Yaklaşımlar.....	16
2.2. Nekrotizan Enterokolit.....	21
2.2.1. Epidemiyoloji.....	21
2.2.2. Patogenez.....	22
2.2.2.1. Prematürite	22
2.2.2.2. Enteral Beslenme.....	27
2.2.2.3. Anormal Bakteriyel Kolonizasyon	27
2.2.2.4. Genetik Yatkınlık	28

2.2.3. Tanı	28
2.2.3.1. Klinik Bulgular.....	29
2.2.3.2. Laboratuvar ve Radyolojik Bulgular.....	31
2.2.3.3. Evreleme	31
2.2.4. Tedavi.....	32
2.2.4.1. Tıbbi Tedavi.....	33
2.2.4.2. Cerrahi Tedavi	33
2.2.5. Prognoz.....	34
2.2.6. Nekrotizan Enterokoliti Engelleme.....	34
2.3. Yenidoğanın İmmün Sistemi.....	36
2.3.1. Fetal İmmün Sistemin Gelişimi.....	37
2.3.2. Doğal İmmün Sistem.....	39
2.3.2.1. Polimorfonukleer Nötrofil Sistemi.....	39
2.3.2.2. Monositler ve Makrofajlar.....	41
2.3.2.3. NK hücreleri.....	41
2.3.2.4. Kompleman Sistemi.....	42
2.3.2.5. Fibronektin ve Adezyon Molekülleri.....	42
2.3.2.6. Sitokinler.....	43
2.3.2.7. Antimikrobiyal Peptidler.....	43
2.3.3. Edinsel İmmün Sistem.....	44
2.3.3.1. T-lenfositler.....	45
2.3.3.2. B-lenfositler.....	49
2.4. Laktoferrin	50
2.4.1 Genel Özellikleri.....	50
2.4.2. Moleküler Yapısı.....	51
2.4.3. Laktoferrinin Biyolojik Fonksiyonları.....	51
2.4.3.1. Antimikrobiyal Özellikler.....	53
2.4.3.1.1. Antibakteriyel Aktivite.....	53
2.4.3.1.2. Antiviral aktivite:.....	56
2.4.3.1.3. Antifungal Aktivite.....	58
2.4.3.1.4. Antiparazitik Aktivite.....	58
2.4.3.2. İmmünmodulator Aktivite.....	58

2.4.3.3. Anti-inflamatuar Aktivite.....	59
2.4.3.4. Antikarsinojenik Aktivite.....	60
2.4.4. Laktoferrinden Elde Edilen Biyoaktif Peptidler.....	61
2.4.5. Laktoferrinin Prebiyotik Özellikleri.....	62
2.4.6. Oral Laktoferrinin Emilimi ve Etki Mekanizmaları.....	62
2.4.7. Laktoferrin Gen Regülasyonu.....	63
3. MATERYAL VE METOD.....	64
3.1. Olguların Seçimi	64
3.1.1. Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri.....	64
3.1.2. Çalışmadan Dışlanma Kriterleri.....	64
3.2. Yöntem.....	64
3.2.1. Olgu Verilerinin Kaydı.....	64
3.2.2. Çalışma Protokolü.....	66
3.2.3. Kan Örneklerinin Çalışılması.....	67
3.3. Tanımlar.....	68
3.4. İstatistiksel Analiz.....	71
3.5. Etik Onay.....	71
3.6. Mali Destek.....	72
4. BULGULAR.....	73
5. TARTIŞMA.....	95
6. SONUÇLAR.....	110
ÖZET.....	113
SUMMARY.....	114
KAYNAKLAR.....	116
EKLER.....	134

KISALTMALAR

ANS	Antenatal kortikosteroid
CPS-1	Karbomoyl fosfat sentaz 1
CD	“Cluster of differentiation”
CR3	Kompleman reseptörü 3
CRP	C-reaktif protein
ÇDDA	Çok düşük doğum ağırlıklı
EGF	Epidermal büyüme faktörü,
EMR	Erken membran rüptürü
ENS	Erken neonatal sepsis
ET-1	Endotelin 1
FOXP3	Forkhead/winged helix transkripsiyon faktörü 3
GBS	Grup B streptokoklar
GITR	Glukokortikoidlerle indüklenen Tumor Nekrozis Faktor reseptörü
GNS	Geç neonatal sepsis
ICAM	İnterselüler adhezyon molekülü
IFN	İnterferonlar
Ig A	İmmunglobulin A
Ig D	İmmunglobulin D
Ig G	İmmunglobulin G
Ig M	İmmun globulin M
IL-6	İnterlökin-6
IL-8	İnterlökin 8
IV Ig	İntravenöz immunglobulin
LF	Laktoferrin
LPS	Lipopolisakkarit
NEK	Nekrotizan enterokolit
NF-κβ	Nukleer faktör kappa beta
NK	Doğal öldürücü
NO	Nitrik oksit
PMN	Polimorfonükleer nötrofil

PPHN	Persistan pulmoner hipertansiyon
RDS	Respiratuar distres sendromu
TGF	Transforme edici büyüme faktörü
TLR	Toll like reseptör
TNF-α	Tumor nekrozis faktör- α
Treg	Regulatuvar T hücre
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü
YYBÜ	Yenidoğan yoğun bakım ünitesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Nozokomiyal sepsis modeli.....	5
Şekil 2.2: Nekrotizan enterokolit patogenezinde yer alan faktörlerin şematik sunumu.....	23
Şekil 2.3: Nekrotizan enterokolitin patogenezi.....	26
Şekil 2.4: Nekrotizan enterokolitli olgu fotoğrafları.....	30
Şekil 2.5: Perforasyon sonrasında batin içinde serbest hava görülen ayakta direkt batin grafisi.....	31
Şekil 2.6: Fetal immün sisteminin gebelik dönemindeki gelişimi.....	37
Şekil 2.7: İmmün sistem hücrelerinin progenitor hücrelerden gelişimi.....	38
Şekil 2.8: T ve B lenfositler arasındaki ilişki.....	46
Şekil 2.9: T lenfosit çeşitleri ve etkileşim mekanizmaları.....	49
Şekil 2.10: Laktoferrin molekülü.....	52
Şekil 2.11: Laktoferrinin antibakteriyel etki mekanizmalarının şematik anlatımı.....	55
Şekil 2.12: Laktoferrinin antiviral etki mekanizması.....	57
Şekil 4.1: Çalışma gruplarının oluşturulması.....	73
Şekil 4.2: Plasebo kontrol grubundan bir hastanın akım sitometri görüntüleri.....	91
Şekil 4.3: Oral laktoferrin grubundan bir hastanın akım sitometri görüntüleri.....	92
Şekil 4.4: Plasebo kontrol grubundaki hastaların doğumda ve taburculuk sonrasındaki FOXP3 değerleri (%).....	93
Şekil 4.5: Oral laktoferrin profilaksi grubundaki hastaların doğumda ve taburculuk sonrasındaki FOXP3 değerleri (%).....	94
Şekil 4.6: Plasebo kontrol ve oral laktoferrin profilaksi gruplarının doğumdaki ve taburculuk sonrası ölçülen FOXP3 (%) değerleri.....	94

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1: Erken ve geç neonatal sepsiste etyolojide yer alan mikroorganizmalar...	6
Tablo 2.2: Sepsiste klinik kriterler.....	9
Tablo 2.3: Neonatal sepsiste ayırıcı tanı.....	10
Tablo 2.4: Yenidoğan yoğunbakım ünitelerinde nozokomiyal enfeksiyonları önlemek için alınacak önlemler.....	19
Tablo 2.5: Anne sütünün immunolojik ve enfeksiyondan koruyucu bileşenleri.....	20
Tablo 2.6: Nekrotizan enterokolitin klinik bulguları.....	29
Tablo 2.7: Nekrotizan enterokolitin laboratuvar ve radyolojik bulguları.....	30
Tablo 2.8: Modifiye Bell evrelemesi.....	32
Tablo 2.9: Polimorfonükleer nötrofillerin işlevleri ve yenidoğandaki yetersizlikleri.....	41
Tablo 2.10: Laktoferrinin antibakteriyel etkisi olan bakteriler.....	55
Tablo 2.11: Laktoferrinin immunmodulator ve anti-inflamator etkileri.....	61
Tablo 4.1: Plasebo kontrol grubundaki hastaların verileri-1.....	74
Tablo 4.2: Plasebo kontrol grubundaki hastaların verileri-2.....	75
Tablo 4.3: Plasebo kontrol grubundaki hastaların verileri-3.....	76
Tablo 4.4: Plasebo kontrol grubundaki hastaların verileri-4.....	77
Tablo 4.5: Oral laktoferrin profilaksi grubundaki hastaların verileri-1.....	78
Tablo 4.6: Oral laktoferrin profilaksi grubundaki hastaların verileri-2.....	79
Tablo 4.7: Oral laktoferrin profilaksi grubundaki hastaların verileri-3.....	80
Tablo 4.8: Oral laktoferrin profilaksi grubundaki hastaların verileri-4.....	81
Tablo 4.9: Plasebo kontrol ve oral laktoferrin profilaksi grubundaki hastaların demografik ve prenatal özellikleri.....	82
Tablo 4.10: Plasebo kontrol ve oral laktoferrin profilaksi grubundaki hastaların erken postnatal dönemdeki sorunlar açısından değerlendirilmesi.	84
Tablo 4.11: Plasebo kontrol ve oral laktoferrin profilaksi gruplarının beslenme özellikleri açısından değerlendirilmesi.....	85
Tablo 4.12: Geç neonatal sepsis için plasebo kontrol grubu ve oral laktoferrin profilaksi grubunda risk faktörlerinin değerlendirilmesi.....	87

Tablo 4.13: Plasebo kontrol ve oral laktoferrin profilaksi grubunda görülen geç neonatal sepsis atakları.....	88
Tablo 4.14: Plasebo kontrol ve oral laktoferrin profilaksi grubundaki GNS ataklarına sebep olan mikroorganizmalar ve dağılımları.....	89
Tablo 4.15: Plasebo kontrol ve oral laktoferrin profilaksi grubunda nekrotizan enterokolit evreleri ve mortalite.....	90
Tablo 4.16: Plasebo kontrol ve oral laktoferrin profilaksi grubundaki hastaların doğumda ve taburculuk sonrası CD4+CD25+ hücrelerinde FOXP3 ekspresyonu....	93

1. GİRİŞ

Çok düşük doğum ağırlıklı (ÇDDA) bebeklerde, nozokomiyal sepsis ve nekrotizan enterokolit (NEK), önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. Yaşamın 72. saatinden sonra gelişen geç neonatal sepsis hastanede yatan ÇDDA bebeklerin % 21'inde görülmektedir (1). Geç neonatal sepsis (GNS) mortalitesi % 18, gram (-) mikroorganizmaların neden olduğu GNS'de ise mortalite % 36 olarak bildirilmiştir (1,2). Nekrotizan enterokolit ÇDDA bebeklerin % 7-10'unda görülmekte, % 20-40 hastada ise cerrahi evreye ulaşmakta ve bu olguların % 15-30'u kaybedilmektedir. Sepsis ve NEK patogeneğinde rol alan inflamasyon uzun dönemde kronik akciğer hasarı ve nörogelişimsel gerilikle de ilişkilendirilmektedir (3).

Son yıllarda daha fazla ve daha güçlü antimikrobiyal ajanların kullanımına rağmen sepsis ve NEK mortalitesinde önemli bir değişiklik kaydedilmemiştir. Epidemiyolojik veriler sepsis ve NEK'in engellenmesi ve tedavisinde sadece antimikrobiyal ajanların kullanımının yeterli olmadığı, inflamasyonu engelleyici yaklaşımların gerektiği düşüncesini gündeme getirmiştir. Bu amaçla yenidoğanın immün mekanizmalarını destekleyen, inflamatuvar yanıtı düzenleyen "anne sütü ile beslenme" dışında, glutamin, arjinin, nitrik oksit, prebiyotik ve probiyotiklerin kullanıldığı araştırmalar yapılmıştır (3-5).

Anne sütündeki immünglobulinler, laktoferrin, lizozim, kazein, laktoperoksidaz, haptokorin, laktalbumin gibi proteinlerin bireysel veya sinerjistik etkiyle antimikrobiyal özelliklerinin olduğu ve içerdiği sitokinler, sIgA ve yine laktoferrinle anne sütünün bağışıklık sistemine destek olduğu gösterilmiştir (6).

Çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerde sepsis ve NEK için engelleyici bakım standartının anne sütü ile beslenme olduğu ortaya konmuştur. ÇDDA bebeklerde sepsis ve NEK'in mortalitesi ile kısa ve uzun dönem morbiditesi ve maliyetin neden olduğu global yük dikkate alındığında, düşük maliyetli, basit, uygulaması kolay engelleyici girişimlerin yararının araştırılması önem taşımaktadır.

Bu amaçla kolosturumda yüksek konsantrasyonda bulunan laktoferrin ile yapısal benzerliği olan sığır laktoferrinin oral proflaksisinin sepsis ve NEK'in engellenmesindeki etkinliği ve mekanizmasının araştırılması planlanmıştır.

İmmün sistemde değişik patojenlere karşı immün cevabı oluşturup yöneten hücre alt grubu CD4+ T hücreleridir. Bu hücreler arasından organizmaya özgü antijenlere ve zararsız dış antijenlere karşı immün cevaplar oluşmasını önleyen, patojenlere karşı yıkıcı immün cevapların kontrolünü sağlayabilen reglatuar T hücre (Treg) alt grupları tanımlanmıştır (7). Son yıllarda reglatuar T hücre grubunun çeşitli hastalıklarla ilişkisini araştıran çalışmalar artmıştır.

Bu prospektif, randomize, plasebo kontrollü klinik çalışma ile;

1. ÇDDA bebeklerde, oral LF profilaksisinin nozokomiyal sepsis ve NEK sıklığını azaltıcı etkisinin araştırılması,
2. ÇDDA bebeklerde oral LF profilaksisinin, T reglatuar hücre düzeylerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yenidoğanda Sepsis

Dünyada her yıl kaybedilen yaklaşık 4 milyon yenidoğanın, 1,1 milyonu sepsis, menenjit ve pnömoni gibi hastalıklar nedeniyle ölmektedir. Yenidoğan ölümlerinin % 98'i gelişmekte olan ülkelerde gerçekleşmektedir (8). Yenidoğan sepsis insidansı, Asya ülkelerinde 1000 canlı doğumda 7,1-38, Afrika ülkelerinde 6,5-23, Güney Amerika'da 3,5-8,9, ABD'de ise erken sepsis 1,5-3,5, geç sepsis 6'dır (8,9).

Sepsis insidansı gestasyon yaşı ve doğum tartısı ile ters orantılıdır, zamanında doğan bebeklerde % 0,1-0,8, çok düşük doğum ağırlıklı (ÇDDA) bebeklerde ise yaklaşık % 20 olarak bildirilmektedir. Bu hastaların % 10-20'si antimikrobiyal tedavilere rağmen kaybedilmektedir (1,10).

Geç neonatal sepsis insidansının ABD'deki çeşitli yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde (YYBÜ) ÇDDA bebekler için % 11 ile % 32 arasında değiştiği gösterilmiştir (1). Doğum ağırlığı ve gestasyon haftası azaldıkça GNS insidansı yükselmektedir. Stoll ve ark.'nın yayınladığı 1998-2000 ABD verilerinde 401-750, 751-1000 g, 1001-1250 g ve 1251-1500 g için GNS insidansı sırası ile % 43, % 28, % 15 ve % 7 olarak bildirilmiştir (1). 2008 yılında Smith ve ark.'nın yine ABD'de 248 YYBÜ'de yaptıkları kohort çalışmada ise doğum ağırlıkları <750 g, 750-999 g ve 1000-1499 g olan prematüre bebekler için enfeksiyon insidansının sırası ile % 37,4, % 22,2 ve % 7,9 olarak belirtmişlerdir (11).

2.1.1. Tanım

Yenidoğan sepsisi, yaşamın ilk dört haftasında mikroorganizmanın invazyonu sonucu oluşan sistemik enfeksiyon bulgu ve belirtilerinin eşlik ettiği kan kültürü pozitifliği ile tanımlanan bir sendromdur (12,13).

Klinik Sepsis; enfeksiyona bağlı olduğu düşünülebilecek özgün olmayan bulgularla birlikte, sepsisin laboratuvar göstergelerinden (beyaz küre sayısı (<5000/mm³ veya >25000/mm³), immatür granülosit/total granülosit oranı >0,2,

sedimentasyon (>15 mm/saat) ve C-reaktif protein yüksekliğine (>0,8 mg/dl) dayanan Phillip-Hewitt Skorlaması'na göre) en az ikisinin bulunmasıdır.

Kanıtlanmış sepsis; sepsis veya lokalize enfeksiyona bağlı klinik bulguların yanı sıra kan kültürünün pozitif olmasıdır.

Erken neonatal sepsis (ENS); yaşamın ilk 7 gününde, esas olarak ilk 48 saat içinde görülen, fulminan seyirli sepsistir.

Geç neonatal sepsis (GNS); yaşamın ilk 7 gününden sonra görülen sepsistir.

Nozokomiyal sepsis; hastanede yatmakta iken, hastanenin genellikle çoklu dirençli mikroorganizmaları nedeniyle, yatıştan en erken 48 saat sonra meydana gelen sepsistir. Çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerde geç neonatal sepsislerin çoğu nozokomiyaldir (12-14).

2.1.2. Risk Faktörleri

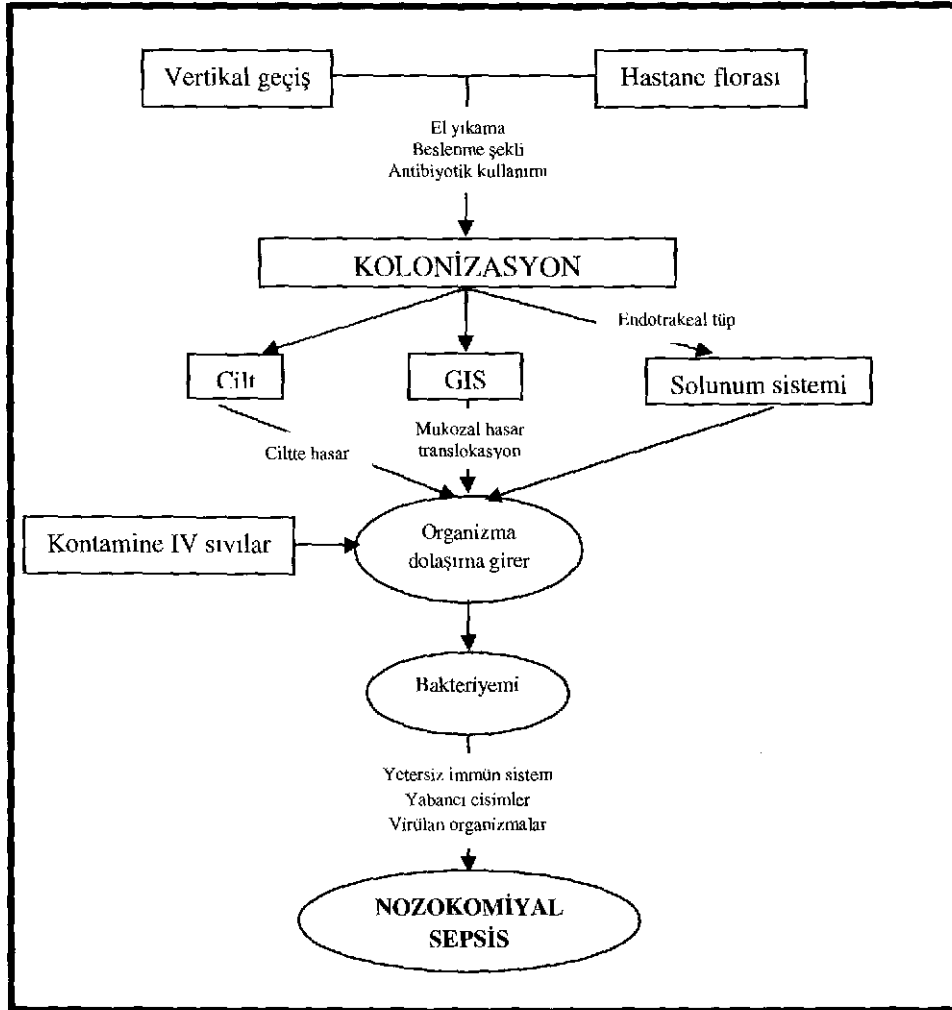
Yenidoğan sepsisi için anneye, bebeğe veya çevreye ait risk faktörleri tanımlanmıştır (Şekil 2.1).

2.1.2.1. Anneye ait faktörler

Prenatal, antepartum ve intrapartum dönemle ilgili değişik risk faktörleri tanımlanmıştır. Annenin sosyoekonomik durumu, ırk ve etnik özellikleri sepsis gelişiminde rol oynamaktadır. Anne yaşının 20'den az veya 30'dan fazla olması, prenatal bakımın yapılmamış olması, düşük sosyoekonomik düzey, prematürelliğe yol açtığı gibi, sepsis için de risk faktörüdür. Amnion kesesinin doğumdan 18-24 saat önce açılması sepsis riskini 10 kat, annede koryoamniyonit bulgularının bulunması bu riski 3 ile 8 kat arttırmaktadır. Prematüre bebeklerde EMR gelişirse sepsis riski % 4-6 civarındadır. Apgar skoru 5. dakikada <6 ise sepsis riski % 3-4 olarak belirtilmektedir. Doğum eylemi sırasında sık yapılan vajinal muayeneler ve müdahaleli doğumlar sepsis riskini artırır (13,14).

Annenin grup B streptokoklar ile kolonize olması durumunda yenidoğan sepsisi riski % 0,5-1 arasındadır. Erken membran rüptürü, ateş veya prematürelilik gibi klinik komplikasyonlar varsa bu risk % 4-7'ye, koryoamniyonit varsa % 20'ye

çıkmaktadır. GBS bakteriürisi veya GBS'li bir ikiz eşi olması durumunda da risk artmaktadır (16).



Şekil 2.1: Nozokomiyal sepsis modeli.

2.1.2.2. Bebeğe ait faktörler

Doğum eylemi, doğum, resesütasyon ihtiyacı, 5. dakika Apgarı <6 olması, erken stabilizasyon döneminde gereken girişimler ve bebeğin ilk dönemdeki klinik durumu gibi faktörler sepsis ile yakından ilişkilidir. Gerek erken gerekse geç sepsis için en önemli risk faktörü prematürelidir. Çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerde, term bebeklerle karşılaştırıldığında, erken sepsis 25 kat fazla görülür ve mortalitesi 4 kat daha fazladır. Nazokomiyal sepsislerin % 93'ü bu bebeklerde görülür (10,12-15). Prematüre bebeklerin hastanede daha uzun süre yatmaları, daha fazla mekanik

ventilasyon, arteriyel ve venöz kateterlerin kullanılması, invaziv girişimlere maruz kalmaları, immün sistemlerindeki yetersizlikler enfeksiyona zemin hazırlamaktadır. Enteral beslenmenin geç başlanması nazokomiyal sepsisi arttıran bir başka faktördür (13-15).

2.1.2.3. Çevresel faktörler

Yenidoğan ilk olarak doğum kanalındaki flora ile sonra ise doğum salonundaki personelin ve ortamın florası ile karşılaşır. Antibiyotiklerin yoğun olarak kullanıldığı YYBÜ'lerindeki dirençli mikroorganizmalarla kolonizasyon saatler içinde gerçekleşmektedir. Hemşire başına düşen bebek sayısında artış, endotrakeal tüp, kateter uygulamaları, kontamine parenteral nutrisyon sıvıları sepsis için risk faktörleridir (13,15) (Şekil 2.1).

2.1.3. Etyopatoloji

Erken ve geç sepsiste, etken mikroorganizmalar farklılık göstermektedir. Erken neonatal sepsiste en sık etken GBS, E. Coli, Listeria, Enterokok ve diğer Gram (-) bakteriler iken, nozokomiyal sepsiste KONS, gram(-) bakteriler ve kandida türleridir (13,17). Tablo 2.1'de etken mikroorganizmalar gösterilmektedir.

Tablo 2.1: Erken ve geç neonatal sepsiste etyolojide yer alan mikroorganizmalar.

	Erken Neonatal Sepsis	Geç Neonatal sepsis
Etken Mikroorganizma	GBS E.Coli S. viridans Enterokok Pnömonokok Listeria H.Influenza, Klebsiella	KONS S. Aureus E.Coli, Klebsiella Pseudomonas Enterokok, Enterobakter GBS, Listeria Candida

Neonatal sepsise klinik tablo ciddi olmasına karşın özgün olmayan, silik histolojik bulgular eşlikdebilmektedir. Çoğunlukla septik şoka bağlı gelişen renal medüller kanama ve kortikal nekroz, akut tübüler nekroz, adrenal kortikal ve medüller kanama, karaciğer nekrozu, intraventriküler kanama ve periventriküler lökomalazi gibi bulgular saptanmaktadır (14). Geç neonatal sepsise eşlik eden organ tutulumları ise menenjit, pnömoni, karaciğer absesi, artrit ve osteomyelit bulgularıdır (13).

2.1.4. Klinik Bulgular

Yenidoğan sepsisinde erken tanı ve tedavi mortalite için belirleyicidir. Sepsis tanısını koyduracak ve tedavi başlanmasını gerektirecek klinik semptom ve bulgular çoğu zaman özgün değildir (Tablo 2.2). Öyküde risk faktörleri iyi değerlendirilmelidir. Semptomlar çok hızlı bir şekilde, saatler içinde, ölüme yol açabilecek şekilde ilerleyebilir. Bu nedenle, “sepsis şüphesi” varlığında antibiyotik tedavisine başlanıp, 48 saat sonra kültürlerin negatif gelmesi ile tedavinin sonlandırılması yaklaşımı benimsenmiştir (13-15,17,18).

Bebeğin “iyi görünmemesi” genellikle ilk belirtidir, ancak tarifi zordur. Bebeğin genel durumunun değerlendirilebilmesi için bebeğin yakından gözlenmesi, davranış ve uyku değişikliklerinin saptanması gerekir. Bebeğin hafif hipotonik olması, öncesine göre daha yavaş beslenmesi, beslenme intoleransı olması, huzursuz veya tam tersi uyaranlara tepkisiz kalması, renginde solukluk, kirlilik, kütis mormaratus olması dikkate alınmalıdır. Bebeklerin girişim, giydirme veya fizik muayene sırasında ağlamaları normaldir. Bebeğin muayene sırasında uyanmaması, ağlamaması ya da susturulamayacak kadar ağlaması normal değildir. Bebeğin postürüne ve hangi pozisyonda rahat ettiğine dikkat edilmelidir. Tüm bu bulguların bebeğin gestasyon yaşı göz önüne alınarak değerlendirilmesi uygundur (14,17,18).

Vital bulgular değerlendirildiğinde; yenidoğan döneminde ateş, enfeksiyon için özgün olmayan bir bulgudur. Bebeğin vücut ısısı $>37,8^{\circ}\text{C}$ 'nin üstünde olabileceği gibi $<36^{\circ}\text{C}$ 'nin altında da bulunabilir veya tamamen normal de olabilir. Çevre ısının yüksekliği, dehidratasyon, kernikterus, beyin kanaması, yaygın hematomların varlığı gibi durumlarda da bebeğin ateşi yükselir. Ateşin bir kez

yüksek bulunması, enfeksiyon göstergesi olarak kabul edilmemeli, bir saat süreyle yüksek kalması ise genellikle enfeksiyonla ilişkilendirilmelidir. Enfeksiyona ait başka bulgular olmaksızın tek başına ateşin yüksek olması, nadir bir bulgudur. Vücut ısısı ne kadar yüksek ya da düşükse, klinik önemi o kadar fazladır (14,18).

Solunum sıkıntısı erken dönemde gelişen bulgulardandır. Bebek istirahat halindeyken, solunum hızı, ritmi, solunum eforu değerlendirilmelidir. Bebekte siyanoz, takipne (solunum sayısı $>60/\text{dak}$), inleme, burun kanadı solunumu, interkostal çekilmeler veya apne görülmesi, sepsis bulgusu olabilmektedir. Takipneye eşlik eden taşikardi (kalp tepe atımı $>160/\text{dak}$) sepsis lehine değerlendirilmelidir. Sepsisli bebeklerde hipotansiyon gelişmeden şok tablosu gelişebilir. Yenidoğanın myokardında yeteri kadar kontraktıl elemanı olmadığı ve inervasyonu da yeterli olmadığı için atım hacmini arttıramaz. Bu nedenle kardiyak atım hacmini arttırabilmesinin tek yolu kalp hızını arttırmaktır. Kapiller doluş zamanı, alt ekstremitelerde, renk soluncaya kadar bastırılması ile bakılır ve 2 saniyeden uzun olması da diğer belirtilerle birlikte sepsisi düşündürür (13-15).

Deri doğal ışık altında incelenmeli, rengi, bütünlüğü, döküntüleri değerlendirilmelidir. Sarılık, solukluk, kül rengi, peteşi, purpura önemli bulgulardır. Yenidoğan döneminde aniden gelişen sarılıklarda, başka bir bulgu olmasa bile enfeksiyon düşünülmelidir. Özellikle ilk 24 saatte gelişen sarılık anormal bir bulgudur ve sepsisli bebeklerin yaklaşık üçte birinde görülmektedir. Sarılığın nedeni endotoksinlerin karaciğere olan etkileri ve hemolizin artmasıdır. Solukluk septik şokun belirtisi, kül rengi cilt de sepsiste ortaya çıkan metabolik asidozun belirtisidir. Peteşiler, sepsisin erken belirtisi olarak kabul edilirken, purpura geç dönemde ortaya çıkmaktadır. Sklerem, özgün olmayan bir bulgu olmasına karşın sepsisin geç dönemlerinde ortaya çıkan ve prognozu kötü olan bir belirtidir (13-15,18).

Gastrointestinal sistem enfeksiyonu bulunmasa bile, sepsisli yenidoğanlarda batın distansiyonu, kusma, regürjitasyon, hafif ishal ve ileus bulunabilir. Bunlar özgün olmayan belirtiler olmalarına karşın, sepsisin ilk işaretleri olabilir. Karın distansiyonunun artması, safralı veya fekal içerikli kusmalar, karın duvarında renk değişiklikleri ve sertleşmeler, ilerlemiş sepsis bulgusu olarak ele alınmalıdır. Göbek çevresinde akıntı, kızarıklık, kötü koku, ödem omfalit ve sepsis bulgusudur (13-15).

Tablo 2.2: Sepsiste klinik kriterler.

	Klinik bulgular
Genel durum	Bebeğin iyi görünmemesi
	Beslenme güçlüğü, meme emmeme
	Cilt rengi kötü (sarı, soluk, kirli, kütis mormaratus, peteşi, purpura), sklerem
	Vücut ısı >37,7 °C ya da <35,5°C
Santral sinir sistemi bulguları	Spontan hareketlerde azalma
	Letarjik, bilinç durumunda azalma
	Konvülzyon, fontanel kabarıklığı
	Hiporefleks, hipotonik
Solunum sistemi bulguları	Solunum sayısı > 60/dak veya apne, bradikardi
	Ciddi göğüs çöküntüsü
	Burun kanadı solunumu, inleme
	Krepitasyon
Dolaşım sistemi bulguları	Taşikardi, bradikardi
	Hipotansiyon
	Siyanoz
	Kapiller dolun zamanında uzama (>2 sn)
Gastrointestinal sistem bulguları	Distansiyon, kusma, rezidü, ileus, ishal
	Göbek etrafında kızarıklık, akıntı, kötü koku
	Safralı kusma, fekaloid kusma
	Hepatomegali
Renal sistem bulguları	Oligüri
Hematolojik sistem bulguları	Peteşi, purpura, kanama, splenomegali

Menenjitin erken dönem bulguları, sepsis bulgularına benzerdir. Ancak huzursuzluk, bilinç değişiklikleri, tiz sesle ağlama, hipotermi, tremorlar menenjitin öncü bulgularındandır. Konvülzyon menenjit olgularının % 40-75'inde bulunur. Beyin abscleri erken dönemde belirti vermeselerde geç dönemde kusma, fontanel gerginliği, baş çevresinde büyüme, kafatası sütürlerinde açılma gibi intrakranyal

basınç artışına ait bulgular ile hemiparezi ve fokal konvülzyon gibi bulgular gözlenebilmektedir (12-14).

2.1.5. Ayırıcı Tanı

Vücut ısısının değişimine yol açan diğer faktörlerden ortam ısı değişiklikleri, dehidratasyon, nörolojik bozukluklar düşünülmelidir. Solunum sıkıntısına yol açan nedenlerden RDS, geçici takipne, mekonyum aspirasyonu düşünülmeli, doğumsal metabolik hastalıkların ve konjenital kalp hastalıklarının bir kısmının sepsis belirtilerine neden olabileceği bilinmelidir (13). Neonatal sepsisin ayırıcı tanısında düşünülmesi gereken hastalıklar Tablo 2.3'te özetlenmiştir.

Tablo 2.3: Neonatal sepsiste ayırıcı tanı.

Kardiyak	Konjenital: Hipoplastik sol kalp sendromu, diğer yapısal hastalıklar Edinsel: Myokardit, hipovolemik veya kardiyojenik şok, PPHN
GİS	NEK, Spontan intestinal perforasyon Yapısal anormallikler
Hematolojik	İmmün trombositopeni, nötropeni, kalıtsal pıhtılaşma bozuklukları Ciddi anemi Neonatal purpura fulminans, konjenital lösemi
Metabolik	Hipoglisemi Adrenal bozukluklar; kanama, yetmezlik, KAH Metabolik hastalıklar: organik asidüri, laktik asidoz, üre siklus defektleri, galaktozemi
Nörolojik	İntrakraniyal kanama Hipoksik iskemik ensefelopati Neonatal konvülzyon
Solunumsal	RDS, Akciğer hipoplazisi, Islak akciğer Aspirasyon pnömonisi: amnion, mekonyum, gastrik içerik Trakeoözöfagial fistül

PPHN: Persistan pulmoner Hipertansiyon, **KAH:** konjenital adrenal hiperplazi

2.1.6. Tanı

Yenidoğan sepsisinin kesin tanısı, kan kültüründe mikroorganizmanın üretilmesi ile konmaktadır. Bu nedenle şüphelenilen her hastadan kan, idrar ve BOS kültürleri için örnek alınarak çoğu zaman kültür sonucu beklenmeden klinik ve laboratuvar işaretler varlığında bebeğin değerlendirilmesi ve gerekli girişimlerin yapılması gerekmektedir. Halen yenidoğan sepsisinde hızlı, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek, tanı koyduracak bir test yoktur. Bu nedenle birçok testin bir arada kullanılması ve erken tanı için birçok değişik test grubu önerilmiştir (13,14).

2.1.6.1. Lökosit sayımı

Lökosit sayımı ve formülü, enfeksiyon tanısı için en sık kullanılan yöntemlerden biri olmasına rağmen, yenidoğanlardaki kullanımı sınırlıdır. Özellikle doğumdan sonraki ilk birkaç gün içinde yenidoğan sayılarının normal değerlerinin değişkenlik göstermesi ve sepsisli yenidoğanlarda lökositoz ($>20000/\text{mm}^3$) olabileceği gibi lökopeninin ($<5000/\text{mm}^3$) de bulunabilmesi, enfeksiyonların tanısında lökosit sayılarının değerini sınırlamaktadır. Total nötrofil sayısı, lökosit sayısına kıyasla daha değerlidir. Doğumdaki alt sınırı $1750/\text{mm}^3$ olan total nötrofil sayısı, 12. saate kadar artarak $7200/\text{mm}^3$ alt sınırına ulaştıktan sonra 72. saate kadar yavaş bir düşme göstererek tekrar $1750/\text{mm}^3$ sınırına düşmektedir. Bu nedenle nötropeni ilk 48 saat içinde nötrofiliden daha değerli bir parametredir. İlk 48 saatten sonra ise hem nötropeni, hem de nötrofil enfeksiyon için önemli bir kriterdir. Bebeklerde, enfeksiyona yanıt olarak kemik iliğinden genç hücrelerin çıkışı genellikle gecikmeli olarak meydana gelir ve her zaman olmayabilir. Bu nedenle sepsisin erken tanısı için kullanımı sınırlıdır. Mutlak sayılardan çok, immatür nötrofillerin total nötrofillere oranının (I/T) daha yüksek tanı değeri vardır. Enfekte olmayan yenidoğanlarda ilk 24 saatteki maksimum I/T değeri 0,16'dır. Bu oran 60. saatte 0,12'ye iner. 32 hafta ve altındaki bebeklerde üst sınır 0,2'dir. Enfeksiyon dışında oksitosin ile uzamış doğum indüksiyonu, uzamış ağlama I/T değerinde yükselmeye sebep olmaktadır. Nötrofillerde toksik granülasyonun bulunması da enfeksiyon göstergesidir, sepsisli bebeklerin % 60'ından fazlasında görülür (12,19).

2.1.6.2. Akut faz reaktanları

Akut faz reaktanları, enfeksiyon, travma ve diğer hücre hasarı yapan olaylara karşı bir reaksiyon olarak, IL-1 aracılığı ile karaciğerden sentezlenen proteinlerdir.

C-reaktif protein (CRP); S. Pneumonia'nın C polisakkaridi ile birleştiğinde çöken bir globulindir. Sıklıkla doku hasarı ile birlikte bulunduğundan, hasarlı dokulardan veya mikroorganizmalardan açığa çıkan toksik maddeleri taşıyan bir proteindir. Enfeksiyon başlamasından sonra CRP'nin yükselmesi, 10-12 saati bulur ve en yüksek düzeyine 60. saatte ulaşır. Serumdaki yarı ömrü 5-7 saattir. Tedavinin başlaması ile birlikte, CRP düzeyleri düşmeye başlar ve bu düşüş tedavinin etkinliğinin izlenmesinde kullanılmaktadır. İlk 12 saat içinde ortaya çıkan erken sepsis ve bazı GBS enfeksiyonlarında CRP'nin spesifitesi oldukça düşüktür, EMR'li, koryoamnionitli anne bebeklerinde yükselmezken, fetal asfiksi, RDS, MAS olan bebeklerde sistemik enfeksiyon olmaksızın CRP'lerinde 10 kata kadar artış görülebilmektedir. Sepsis tanısında CRP için sınır değer olarak, 1,2-6 mg/dl'nin kullanıldığında % 84-96 spesifite ve negatif tahmin ettirici değerin % 93-99 olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (13,14,19-21).

Enfeksiyonun başlangıç döneminde CRP yavaş arttığı için pozitif tahmin değeri düşüktür ve bu nedenle sepsis tanısı için tek başına kullanılmamalıdır. Sepsis taramasında ancak başka testlerle birlikte kullanıldığında anlamlı olabilmektedir. Tedavinin etkinliğinin değerlendirilmesi ve antibiyotik tedavisinin sonlandırılması kararının verilmesinde faydalı ve güvenilir bir göstergedir (19-21).

Eritrosit sedimentasyon hızı; bakteri enfeksiyonlarında artmasına rağmen, bu artış geç dönemde de meydana gelebileceğinden, erken tanı için kullanılamaz. Öte yandan, iyileşen hastalarda bile sedimentasyon uzun süre yüksek kalabilir ve bu nedenle tedavinin değerlendirilmesinde de uygun değildir (19,21).

Sitokinler; sepsisin erken tanısında kullanılmaktadır. IL-6 inflamatuvar yanıt olarak monositler, endotel ve fibroblastlardan salgınır. IL-6, karaciğerde CRP, fibrinojen ve serum amiloid A proteini gibi akut faz reaktanlarının yapımını uyarır. Bu nedenle serumda CRP artışından önce yükselmesi beklenir. Sepsis tanısında duyarlılığı % 86 olarak bulunmuştur. Yarı ömrü çok kısadır ve tedavi başlanması sonrasında hızla düşerek 24 saat içerisinde saptanamaz hale gelir. Klinik olarak

sepsis düşünölen hastalarda CRP ile birlikte bakılması duyarlılığı artırmaktadır (19,21).

IL-8; sistemik enfeksiyon ve inflamasyona yanıt olarak aktive fagositler tarafından üretilir. Erken ve geç sepsiste yüksek bulunur. Duyarlılığı % 80'den fazla, özgülölüğü ise %100'e yakındır (19,21).

IL-1 reseptör antagonisti; bakteriyemiden 2-4 saat sonra serumda artar ve 24 saat yüksek kalır. Sepsis tanısındaki duyarlılığı % 93 civarındadır. Diğer yandan IL-6 ile birlikte bakılması, sepsisin klinik bulgular ortaya çıkmadan 2 gün öncesinde pozitif sonuç vererek tedavinin çok erken başlatılabilmesine olanak tanır (22).

Prokalsitonin; monosit ve hapatositler tarafından üretilen bir akut faz reaktanıdır. Endotoksinin kana karışmasından 3-4 saat sonra hızla artar, 6-8 saatte zirveye ulaşır ve 24 saat yüksek kalır, 2-3 gün sonra normale döner. Duyarlılığı % 87, özgülölüğü % 100 bulunmuştur. Düzeyi hastalığın şiddeti ve ölüm ile ilişkilidir. Viral enfeksiyon, asfiksi, MAS, bakteri kolonizasyonu gibi enfeksiyon dışı inflamatuvar olaylarda yükselmez veya çok hafif yükselir. Postnatal erken dönemde endojen bir yükselme görölebildiği için erken neonatal sepsis tanısında kullanımı kısıtlıdır. İntrapartum antibiyotikler kordonda prokalsitonin düzeyini azaltırken, postnatal antibiyotikler de prokalsitonin düzeyini CRP'den çok daha hızlı bir şekilde azaltır (19,21).

2.1.6.3. Birleşik testler

Sepsis tanısında kullanılan testlerin hiçbirisinin tek başına tanısal olmayışı, bu testlerin klinik bulgularla birleştirilerek kullanılmasını gündeme getirmiştir. Bu amaçla değişik skorlama sistemleri geliştirilmiştir. Birleşik testlerle pozitif tahmin değerlerinde anlamlı değişiklikler olmazken, negatif tahmin değerleri %100'lere yaklaşmaktadır (13,14,19-21).

2.1.7. Tedavi

Öykü ve klinik bulgularla sepsisten şüphelenilen tüm yenidoğanlarda, kültürler alındıktan sonra hemen antibiyotik tedavisi başlanmalıdır.

2.1.7.1. Antibiyotik tedavisi

Sepsis şüphesinde başlanacak antibiyotiklerin seçimi birçok faktöre bağlıdır. Bunların arasında hastalığın başlama zamanı (erken veya geç sepsis), ünite de en sık karşılaşılan mikroorganizmalar ve bunların antibiyotik dirençleri, enfeksiyonun muhtemel odağı ve antibiyotiklerin bu odağa penetrasyon güçleri ile antibiyotiklerin güvenlik profilleri sayılmaktadır. Sepsis şüphesinde genellikle iki antibiyotik, antibakteriyel spektrum genişletmek ve ilaçların sinerjistik etkilerinden yararlanmak için başlanmaktadır (13,14).

Erken neonatal sepsiste seçilecek antibiyotiklerin GBS, E. Coli, L.monocytogenes, S. Aureus ve diğer gram (-) basillere karşı etkili olması hedeflenmektedir. Bunun için penisilin veya sentetik bir penisilin ile bir aminoglikozid kombine edilir (13,14).

Toplum kaynaklı GNS'de etkenler GBS ve gram (-) basiller olabileceği gibi, pnömokok, H influenza ve meningokok da olabilir. Bu hastalıklarda menenjit de sık görüldüğü için, seçilecek antibiyotiklerin BOS'a geçişlerinin iyi olması istendiği için en sık kullanılan ampicilin ve 3. Kuşak bir sefalosporin, sıklıkla sefotaksim kombinasyonudur (13,14).

Nozokomiyal sepsislerde, koagülaz negatif stafilokoklar, gram (-) enterik basiller ve mantarlar görülmektedir. Kateter veya şantların bulunduğu hastalarda stafilokoklar daha sık görüldüğü için böyle bir risk faktörü olan hastalara stafilokoklara etkili bir antibiyotiğin tedaviye eklenmesi gerekmektedir. Stafilokokların çoğu penisilinaz ürettiği için penisilinaza dirençli metisilin, nafsilin veya vankomisin kombinasyon tedavisinde yer almalıdır. Penisilinlere karşı dirençli tüm stafilokokları sefalosporinlere karşı da dirençli kabul etmek gerekmektedir. Pseudomonas enfeksiyonu şüphesi varsa seftazidim veya bir aminoglikozit kullanılmalıdır. Ampirik tedavi kombinasyonları olarak; vankomisin+aminoglikozid, vankomisin + seftazidim, piperasilin-tazobaktam + aminoglikozid kullanılmaktadır. Kültür üremeleri belli olduktan sonra, mikroorganizma ve antibiyograma göre tedavi düzenlenmelidir, mümkünse tek ilaçla devam edilmelidir (13,14).

Tedavi süresi antibiyotiklere verilen ilk yanıtla ilişkili olmakla beraber, fokal enfeksiyonu olmayan sepsislerde 7-10 gün yeterli olur. Grup B streptokok ya da

gram (-) enterik bakterilerle oluşan menenjitlerde tedaviye 14-21 gün devam edilmelidir (13,14).

Kültür sonuçları negatif gelen hastada, bebeğin genel durumu iyiye ve belirtilerin sepsise bağlı olma ihtimali düşük ise, üç günlük bekleme süresi sonunda üremesi olmayan hastanın antibiyotik tedavisi kesilmelidir. Klinik durum düzelmüyorsa ve hala enfeksiyonu düşündürecek bulgular varsa, hasta sepsis olarak değerlendirilmeli ve tedavi devam ettirilmelidir. Ayrıca kültürler negatif bile olsa, ilk üç günlük tedaviye olumlu yanıt veren olgularda, klinik semptomları açıklayacak başka bulgu ve hastalık yoksa sepsis gibi kabul edilerek tedavi 10-14 güne tamamlanmalıdır (13,14).

2.1.7.2. Destek tedavisi

Sepsisli bebekler mutlaka YYBÜ’de takip edilmelidir. Solunum ve dolaşım yetmezliğinin izlemi, sıvı-elektrolit dengesinin düzenli kontrolü ile kan basıncı ve periferik dolaşımın düzenlenmesi son derece önemlidir. Solunum destek tedavisi gereksinimi belirlenmelidir. Kardiak output ve perfüzyon, gerektiğinde volüm infüzyonu veya pressör ajanların kullanımı ile normal sınırlar içerisinde tutulmalıdır. Anemi, trombositopeni ve dissemine intravasküler koagülasyona kan ürünleri transfüzyonu yapılması gerekmektedir (12-14).

İmmunoterapi; sepsis tedavisinde gerek standart intravenöz immunglobulin (IV Ig), gerekse Ig M’den zengin IV Ig kullanılmıştır. Profilaktik olarak IV Ig verilmesinin sepsisi önlemede faydalı olmadığı, buna karşılık sepsis gelişen olgularda IV Ig verilmesinin mortaliteyi azalttığı gösterilmiştir (23). Ancak rutin kullanımının önerilebilmesi için daha fazla hasta üzerinde randomize, plasebo kontrollü çalışmaların yapılması gerekmektedir (4,13).

Sitokin tedavisi; ağır yenidoğan sepsislerinde görülen nötropeninin nedeni olarak granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) eksikliği ileri sürülmüştür. Enfeksiyonlarda kemik iliğinden nötrofil salınımı da azalır. Granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF), kemik iliğinden immatür nötrofillerin salınımını artırırken, progenitor hücrelerden yeni nötrofil yapımını da uyarmaktadır. GM-CSF de, myeloid kolonilerinin ve nötrofillerin salınımını artırır. Bu ajanlar verilerek

nötrofil sayısı ve havuzunu arttırmanın mortaliteyi azaltabileceği düşünülmektedir, ancak rutin kullanımını önermek için yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır (4,13).

2.1.8. Prognoz

Yapılan tedavinin etkinliğinin izlenmesi önemlidir. Birçok sepsis olgusu, 24-48 saat içinde düzelmeye başlar. Lökosit sayısı ve I/T oranları 72. saatte normalleşir. CRP'deki düşüş ise 48-72 saat içinde gerçekleşir; düşüş olmaması tedaviye yanıtın yeterli olmadığını gösterir.

Erken başlayan ve fulminan seyreden sepsislerde mortalite % 30'dan fazladır. Geç sepsislerde ise mortalite daha yüksektir. Gram (-) enfeksiyonlarla oluşan sepsis mortalitesi gram pozitiflere göre daha fazladır (1,9-11,13).

Yenidoğan menenjitli geçiren bebeklerden yaşayanların % 20-50'sinde ciddi sekeller kalır. Bunlar arasında zeka gerilikleri, motor fonksiyon bozuklukları, konvülsyonlar, hidrosefali, işitme kaybı ve konuşma bozuklukları sayılmaktadır (13,14).

2.1.9. Sepsisi Engelleyici Yaklaşımlar

Sepsisi engellemek, tedavi etmeye çalışmaktan daha önemlidir. ÇDDA bebeklerde nozokomiyal sepsisi engellemek için, kalite artırma projesi olarak yapılan bir çalışmada, "Vermont Oxford Network"de en düşük nozokomiyal sepsis oranlarına sahip iki ünitenin yaklaşımları incelenmiştir. Bu iki ünitenin en önemli özelliklerinin, ÇDDA'lı bebeklerde gelişen nozokomiyal sepsisin; bakım ekibinden bağımsız, bebeğin yetersiz bağışıklık sistemi ve mutlak gereklilikteki kateter, ventilasyon, TPN gibi invaziv girişimlere bağlı olarak engellenemez bir durum olduğunu ve bakım ekibinin en önemli odağının enfeksiyon semptomlarını erken tanıyıp erken tedavi başlamak olduğunu düşünmek yerine, yetersiz immün sistemi ve mevcut riskleri çok iyi bilip, bu riskleri azaltmaya yönelik bakım koşulları geliştiren, nozokomiyal sepsisin engellenebilir olduğuna inanan ekipler olduğu ortaya konmuştur (24).

Erken ve geç neonatal sepsisi engellemek için, doğum öncesi, doğum esnasında ve sonrasında yapılması gerekenler;

Doğum öncesi dönemde annenin prenatal bakım alması, beslenmesinin iyileştirilmesi yenidoğan sağlığındaki iyileşmeyle yakından ilişkilidir. Yapılan randomize kontrollü çalışmalarda annenin protein ve kalori alımının düzenlenmesinin, eser element ve vitamin desteklerinin sağlanması prematüre ve doğum ağırlıkları üzerinde olumlu etkisi gösterilmiştir (5,25,26). Gebelere tetanoz ve influenza aşılarının yapılması da çok başarılı sonuçlanmıştır (5). Annenin *S. agalactiae* ile aşılması ile ilgili yapılan ön çalışmanın verileri değerlendirildiğinde, ABD'deki preterm doğumların % 4'ünü ve neonatal *S. agalactiae* enfeksiyonlarının % 60-70'ini engelleyeceği öngörülmüştür (5, 27).

Doğum esnasında ellerin yıkanması hem ev hem de sağlık kuruluşlarındaki doğumlardaki sepsis oranını azalttığı bilinmektedir. Doğum sürecinde anneye antibiyotik yapmak hem neonatal hem de maternal sepsisi azaltmakta çok etkilidir. Antibiyotik profilaksisi ABD'de, 1993'deki binde 1,7'lik *S. agalactiae*'ye bağlı ENS oranının, 1998'de binde 0,6'ya düşmesini sağlamıştır (5).

Doğumdan sonra yoğun bakım koşullarında nozokomiyal sepsisi önlemek için alınacak önlemler Tablo 2.4'de özetlenmiştir (13). Özellikle sağlık çalışanlarının el yıkama politikalarını benimsemeleri gerekmektedir. El yıkamanın sepsis engellemedeki etkinliği 19. yüzyıldan itibaren biliniyor olmasına rağmen, tüm dünyada, en gelişmiş toplumlarda bile doğru el yıkama protokollerini oturtmak çok zor olmuştur. Tüm sağlık çalışanları el yıkamanın önemini bilmekte ancak bireysel uygulamalarında yetersiz kalmaktadırlar (24,28). El yıkama ile karşılaştırıldığında el dezenfektanı kullanımının daha yaygın olduğu ancak bu solüsyonların elleri mikroorganizmalardan arındırma ile ilgili çalışmaların sonuçları birbirlerinden oldukça farklıdır (29,30).

Gelişmekte olan ülkelerde el yıkama politikalarının yerleşmesine engel olan başlıca faktörler; hastanelerde su, sabun, lavabo yetersizliği, çok fazla hastaya bakmak zorunda olan düşük moralli az sayıdaki sağlık personelinin varlığıdır. Yoğun bakım ünitelerinden düşük riskli bebeklerin erken taburculuğu, servis iş yükünü azaltarak enfeksiyon oranlarının düşmesini sağlayabilecektir (31).

Sağlık çalışanlarının ellerindeki irritasyon olması ve deri bütünlüğünün bozulması da kolonizasyon türlerini artırarak enfeksiyon oranlarını arttırmaktadır. Aynı zamanda uzun, ojeli ve protez tırnakların *Ps. aureginosa* başta olmak üzere gram (-) bakteriler için potansiyel risk faktörü olduğu gösterildiğinden, YYBÜ'lerinde kullanımı uygun değildir (24).

Yüksek gelirli ülkelerde, göbek kordonunun antiseptiklerle ya da antibiyotikle temizlenmesinin sadece temiz tutmaya üstünlüğü gösterilememiştir (8). Oysa Nepal gibi düşük gelirli ülkelerde klorheksidin kullanımı neonatal ölümleri azaltmıştır (32). Prematüre bebeklerin özellikle ilk haftalarda oldukça hassas olan ciltlerinin bütünlüğünün korunması çok önemlidir. Kan alma, damar yolu açma gibi girişimler dışında ciltlerine yapıştırılan maddelerin kaldırılması sırasında cilt hasarlanarak enfeksiyon ajanları için giriş bölgesi oluşturmaktadır (24). Prematüre bebeklerin cilt bakımında kullanılacak yağlarla ilgili yapılan çalışmalar enfeksiyon riskini arttırmaları nedeniyle önerilmemektedir(33).

ÇDDA bebeklerdeki nozokomiyal enfeksiyonlar, yapılan tüm çalışmalarda santral kateter kullanımı ile ilişkili bulunmuştur. Kateter kullanımı özellikle koagülaz negatif stafilokok enfeksiyonları için risk faktörüdür (1,9,11,15,17). Bu nedenle nozokomiyal enfeksiyonu azaltmak için kan alma, kateter kullanma gibi invaziv girişimleri azaltan politikaları benimsemek gerekmektedir. Kateter takılması tamamen steril cerrahi koşullarda uygun lokal dezenfeksiyon sonrasında deneyimli ekip tarafından yapılmalıdır (24). Sağlık personelinin bu konuda eğitilmesinin erişkinde kateter ilişkili enfeksiyonları % 28 oranında azalttığı gösterilmiştir. Yenidoğanda yapılan bir kalite artırma çalışması öncesi ve sonrası değerler karşılaştırıldığında santral venöz kateter ilişkili bakteriyemi riskinin azaldığı saptanmıştır (RR: 0,27) (34).

Kateter kaynaklı sepsis, mikroorganizmanın kateterin cilde girdiği yerden ya da direkt olarak kateter içinden ilerlemesi ile oluşmaktadır. Bu nedenle katetere yapılacak girişimlerin, takılan serum setlerinin ve kapak değişimlerinin steril koşullarda alkol bazlı solüsyonlarla temizlenme sonrasında yapılmasının kolonizasyonu ve enfeksiyonu azalttığı gösterilmiştir (24,35).

Tablo 2.4: Yenidoğan yoğunbakım ünitelerinde nozokomiyal enfeksiyonları önlemek için alınacak önlemler.

	Önlemler
Evrensel önerilerin takibi	Eldiven, önlük, maske ve izolasyon önlemleri
Bakım koşulları	Uygun hemşire-hasta oranının sağlanması Servis yoğunluğunu ve aşırı iş yükünü azaltma Ulaşılabilir lavabo, antiseptik solüsyonlar, sabun, kağıt havlu temini
El yıkama	El yıkama uyumunun arttırılması Her hastadan önce ve sonra el yıkanması Sabun, alkol bazlı ya da antiseptik solüsyonların uygun kullanımı Her hasta yatağının yanında alkol bazlı antiseptik solüsyon bulunması Çalışanlar için eğitim ve geri bildirimin sağlanması
Santral venöz kateter kontaminasyon riskini azaltmak	Kateter takılması esnasında maksimum sterilite önlemlerinin alınması Lokal antisepsinin klorheksidin ile sağlanması Laboratuar testleri için kateterden kan örneği alımının en aza indirilmesi Kateter işlemleri sırasında asepsi kurallarına uyulması Kateterli gün sayısını azaltma Kateterden verilecek tüm sıvıların steril hazırlanması
Cilt bakımı	Cilde hasar verecek yapışkan bantların mümkün olduğunca az kullanılması, çıkarılması esnasında dikkatli olunması
Beslenme	Erken ve anne sütü ile beslenmenin sağlanması
Yoğun bakım çalışanları	Sürekli eğitim ve geri bildirimlerin sağlanması
Yoğun bakım verileri	Nozokomiyal enfeksiyon oranlarının sürekli kaydı

Anne sütü (AS) kullanımı, yenidoğan bebeği enfeksiyondan korumada en önemli faktördür. Anne sütü sekretuar Ig A, lizozim, lenfosit ve laktoferrin içerir ve içeriği ile laktobasil çoğalmasını desteklerken, E. coli ve diğer gram (-) patojen bakterilerin gelişimini engellemektedir (5,6). Anne sütünün içerdiği immünolojik ve enfeksiyondan koruyucu bileşenleri Tablo 2.5’de özetlenmiştir (36). Gözlemsel çalışmalar AS’nin, neonatal dönemdeki, sepsise bağlı ve tüm ölümleri azalttığını göstermektedir. Ancak AS kullanımının sepsis üzerine etkisini sadece mama kullanımı ile karşılaştıracak randomize kontrollü bir çalışma yapılması etik olmadığı için, yapılan çalışmalar AS kullanım süresi ve miktarı ile ilgili farklı kriterler belirleyerek çalışma gruplarını oluşturabilmişlerdir. Buna rağmen tüm çalışmalar AS’nün sepsis ve NEK azaltıcı etkisini göstermiştir. Çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerde AS ile tamamen enteral beslenmeye 2. hafta içinde geçememenin geç neonatal sepsisi 3,7 kat arttırdığı 2005 yılında yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (37).

Tablo 2.5: Anne sütünün immünolojik ve enfeksiyondan koruyucu bileşenleri.

Spesifik immün faktörler	Sekretuar Ig A, Ig G, Ig M, Ig E, Ig D
Sitokinler, Kemokinler ve reseptörler	IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18, IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, “Toll like receptor”,
Doğal immün sistem bileşenleri	Kompleman, kemotaksi faktörleri, laktoferrin, lizozim, properdin, interferon, alfafetoprotein, “antiadherence” bileşikleri (ligosakkarid, musin, laktadherin, glikan, k-casein), antiviral faktörler, antimikrobiyal peptidler
Hormon ve büyüme faktörleri	Prolaktin, krtizol, insulin, tiroksin, prostoglandinler, eritropoetin, EGF, VEGF, TGF
Hücreler	Toplamda Kolostrumda: $1-3 \times 10^6$ /ml Matür sütte: 1×10^5 /ml Makrofajlar (% 60), Nötrofiller (% 25), lenfosit (% 10)
Prebiyotik, bifidojenik faktörler, oligosakkaridler	

2.2. Nekrotizan Enterokolit

Nekrotizan enterokolit (NEK) yenidoğan yoğun bakım ünitelerindeki morbidite ve mortalitenin başlıca nedenlerinden biri ve yenidoğanın en sık görülen gastrointestinal sistem (GIS) acilidir. Barsak duvarının mukozal başlayıp transmurala ilerleyen koagülasyon nekrozu ile karakterize hastalığıdır (38).

Nekrotizan enterokolit terimi ilk olarak 1950’li yıllarda ölen bebeklerin gastrointestinal sisteminde nekrotik lezyonlar için Schmidt ve Quaiser tarafından kullanılmıştır (39). Bell ve arkadaşları ise 1978 yılında NEK’li hastaların klinik evrelemesi için bir sistem oluşturmuşlardır (40). Walsh ve Kliegman ise 1986 yılında, radyolojik bulguları da ekleyerek bu evreleme sistemini geliştirmişler ve günümüzde kullanılan “Modifiye Bell Evreleme Sistemi” oluşmuştur (41).

2.2.1. Epidemiyoloji

Prematürite NEK için en önemli risk faktörüdür. Nekrotizan enterokolit vakalarının sadece % 5-10’unu zamanında doğan bebekler oluşturur (42). Asfiksiye maruz kalan, intrauterin gelişme geriliği olan, polisitemi-hiperviskozitesi olan, kan değişimi yapılması gereken, umbilikal kateter takılan, konjenital kalp hastalığı olan zamanında doğan bebekler risk grubundadır. Azalan gestasyon yaşı ve doğum ağırlığı ile görülme sıklığı ve mortalite arasında ters orantı vardır. Bu nedenle obstetrik ve neonatal bakım koşullarının gelişmesi daha fazla ÇDDA bebeğin yaşamasına olanak tanırken, NEK için risk altında olan prematüre bebeklerin sayısı giderek artmaktadır. Özellikle <1000 g ve <28 hf olan bebekler risk altındadır. Yenidoğan yoğunbakımda yatan tüm bebekler için insidansı % 1-5 (43), mortalite % 10-30 arasında iken (44), 500-1500 g arası bebekler için prevalans % 7-14’e (45) mortalite ise % 20-50’ye yükselmektedir (46). Daha küçük ve daha ciddi hastalığı olan ve cerrahi gerektiren bebeklerde mortalite artmaktadır. Cerrahi evre NEK oranı, tüm NEK vakalarının % 20-40’ı olarak tahmin edilmektedir (43-48). Cerrahi geçiren hastalarda yara yerinde açılma, batın içinde abse, barsak striktürleri gibi erken dönem komplikasyonları görülebilirken uzun dönemde ishal, büyüme geriliği, kısa barsak

sendromu gelişebilmektedir. Nekrotizan enterokolitli hastalarda uzun dönemde yaşadıkları en önemli sorun nörogelişimsel olumsuzluklardır (49).

Nekrotizan enterokolitin başlangıcı saatler içerisinde olabileceği gibi, günler öncesinden beslenme intoleransı ile de başlayabilir. Bebeğin NEK geliştiğindeki postnatal yaşı gestasyon yaşı ile ters orantılıdır. Term bebeklerde hayatın ilk birkaç gününde ortaya çıkarken, pretermelerde beslenmeye başladıktan haftalar sonra olabilir (47,48,50).

2.2.2. Patogenezi

Nekrotizan enterokolitin etyoloji ve patogenezi net olmamakla birlikte multifaktöryel olduğu düşünülmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar prematüritenin dışında, hipoksik iskemik hasar, mama ile enteral beslenme ve barsakların bakteriyel kolonizasyonuna bağlı olduğunu düşündürmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bazı genetik polimorfizm taşıyıcılığının NEK'in de dahil olduğu çeşitli morbiditelerle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Prematüre bebeğin GIS motilitesindeki, sindirim kapasitesindeki, intestinal dolaşım regülasyonundaki, bariyer fonksiyonlarındaki ve immün yanıtlarındaki yetersizlik intestinal hasara ve uygunsuz cevaba neden olmaktadır (Şekil 2.2) (47,48).

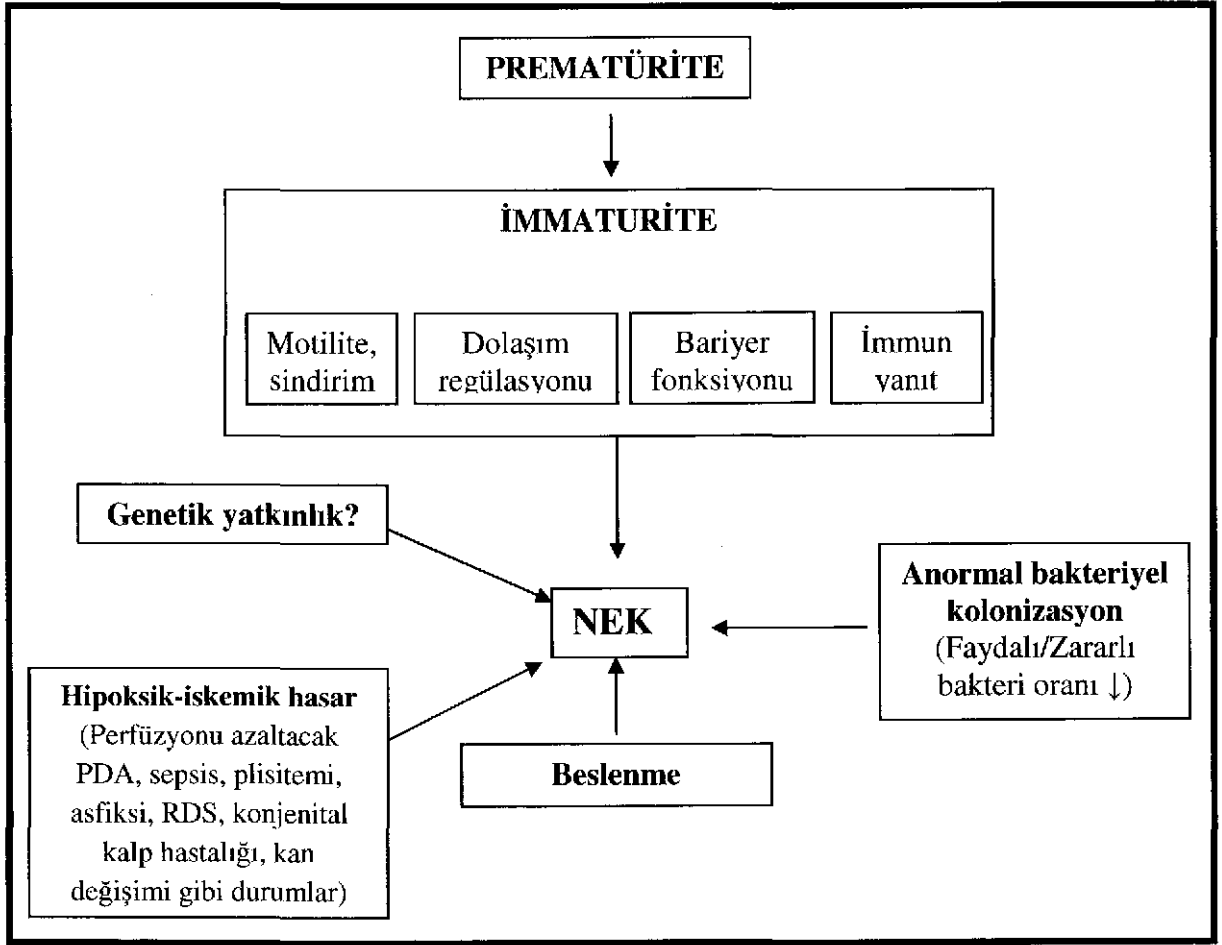
2.2.2.1. Prematürite

Prematürite NEK için tek gerçek risk faktörüdür. Prematüre bebeklerin NEK geliştirmeye yatkınlığı özellikle intestinal immatürite ile ilişkilidir.

İmmatür intestinal motilite ve sindirim; motilite, mukozal bariyere temas eden lümendeki antijenlerin temizlenmesi için en önemli faktördür. Emilim için gerekli olan süre luminal içeriğin hızı ile bağlantılıdır. Gastrointestinal sistem motilitesi 2. trimestırda başlayıp 3. trimestırda olgunlaşmaktadır. Bağırsak boyunca dalgalar halinde yayılan motor kompleksleri 34. haftada gelişmektedir. Fetal hipoksiye neden olabilen maternal veya fetal hastalık durumları postnatal intestinal motiliteyi daha da azaltmaktadır. Bu yetersiz motilite paterni normal peristaltik

aktivitede değişikliklere sebep olarak, sindirilememiş besin içeriği ile birlikte ince bağırsakta anaerobik bakteri çoğalmasına neden olur (Şekil 2.3) (47,48,51).

Prematüre bebeklerin sindirim ve absorpsiyon yeteneğinin yeteri kadar gelişmemesi de NEK patogenezinde katkıda bulunmaktadır. Yenidoğanlarda pankreasın ekzokrin fonksiyonları yetersizdir. Gastrik asit, pankreatik ve safra sekresyonlarının sınırlı olması, proteolizin az olmasına, sonuç olarak da daha fazla bakteriyel ve antijenik bir yük oluşmasına neden olur (47,52).



Şekil 2.2: Nekrotizan enterokolit patogenezinde yer alan faktörlerin şematik sunumu.

İmmatür intestinal bariyer; faydalı bakterilerle simbiyotik, potansiyel patojenlere karşı ise koruma şeklindeki ideal intestinal bariyer fonksiyonunu sağlayamamaktadır. İntestinal bariyer fonksiyonu yapısal ve biyokimyasal yapılardan oluşur (Şekil 2.3) (47,48).

Yapısal bariyer: Bağırsak epitel hücreleri, intestinal geçirgenliği kontrol eden sıkı bağlarla birbirlerine bağlıdır. Bu sıkı bağlar gestasyonun 10. haftasında bile mevcuttur ancak sıkı bağlar tam geliştiğinde, intestinal bariyer küçük iyonlara, besin emilimine ve iki yönlü sıvı hareketine izin verecek geçirgenliğe izin verecek yapıda olur (47,48,53). Enterositler klor ve su sekresyonu ile lümeni istenmeyen patojen ve toksinlerden yıkayarak korur. Bu sekretuar özellik fetusta amnion sıvısı maruziyeti ile 26. haftadan sonra terme kadar kademeli olarak artarak gelişir (48,54).

Goblet hücreleri, mukoza üzerinde kalın koruyucu bir tabaka olan musini sentezleyen özelleşmiş enterositlerdir. Bu musin tabakası patojenlerin direkt mukoza ile temasını engeller ve mukozaya yapışan bakterileri uzaklaştırır. Prematürelerde olgunlaşmamış goblet hücreleri vardır. Musin genlerinin gelişimsel olarak olgunlaşıp erişkin tipine dönmesi yani daha viskoz ve koruyucu olması 23-27. gestasyon haftalarından sonradır (48).

İnsan ve hayvan çalışmaları intestinal epitelin bütünlüğünün sağlık için önemini ortaya koymuştur. Preterm bebeklerin barsak geçirgenliği artmıştır, bu durum NEK'li hastalarda daha belirgindir. Histopatolojik değerlendirmelerde apopitoz ya da nekroza bağlı epitel kaybının inflamasyondan önce olduğu, hatta patogenezi başlatan mekanizma olduğu düşünülmektedir. Prematüre epiteli apopitoza neden olacak hasarlara karşı daha duyarlıdır (48,55).

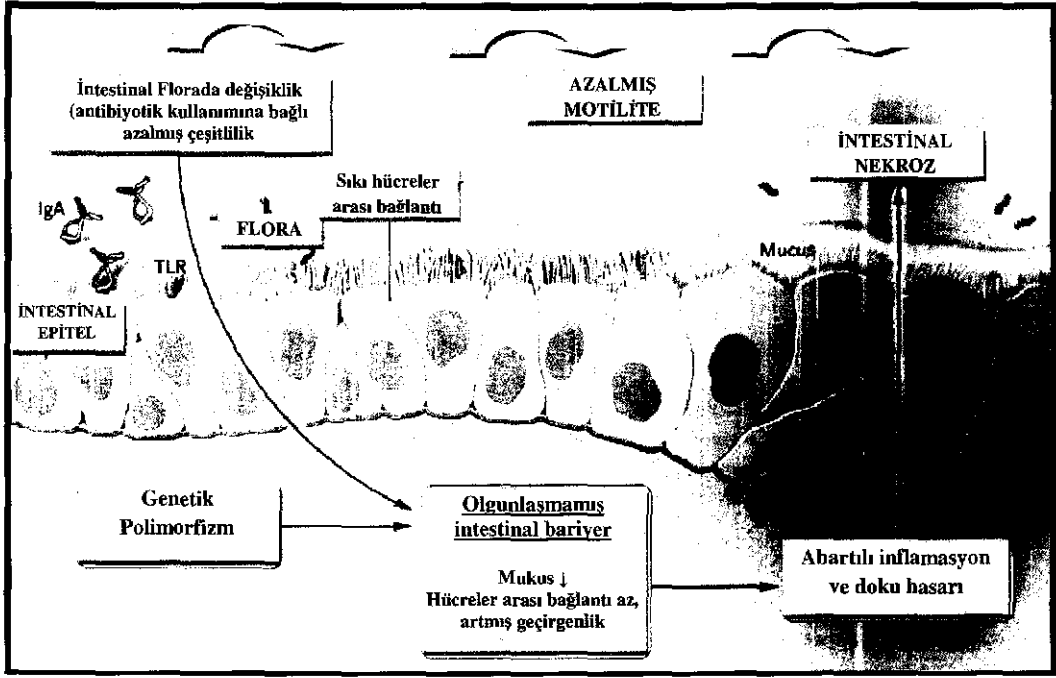
Bağırsak epitel bütünlüğü prostaglandin, nitrik oksit (NO) ve epidermal büyüme faktörü (EGF) ile kontrol edilmektedir. Prostaglandinler sıkı bağların fonksiyonunu artırarak epitel bütünlüğünü artırmaktadırlar; bu nedenle bir prostaglandin inhibitörü olan indometazin ile spontan barsak perforasyonları arasında ilişki vardır. Nitrik oksidin barsak fizyolojisinde paradoksik bir rolü vardır. Düşük düzeyleri mukozal kan akımı ve mukoza bütünlüğünü korumak için gerekli iken, yüksek düzeyleri membran oksidasyonu, epitel apopitozunu indükleyerek ve direkt mitokondri hasarı ile sitopatik (48,56). Epidermal büyüme faktörü hasara yanıt olarak epitel hücrelerinin migrasyonunu ve çoğalmasını uyarır ve intestinal hasarı azaltır (48,55). Hayvan modellerinde verilen EGF'nin mukozal bütünlüğü kuvvetlendirdiği ve deneysel NEK ciddiyetini azalttığı, NEK'li prematürelerin ise tükürük ve serumunda EGF düzeylerinin azalmış olduğu gösterilmiştir (57).

Biyokimyasal bariyer: İntestinal mukozada kriptlerin tabanında yer alan özelleşmiş enterositlere “Paneth hücreleri” adı verilir. Bu hücreler lizozim, fosfolipaz A2 ve bakteri popülasyonunun içeriğini ve dağılımını düzenleyen antimikrobiyal küçük peptidleri salgılayarak intestinal epitelin biyokimyasal bariyere katkıda bulunurlar (48).

İntestinal antimikrobiyal peptidler doğal antibiyotiklerdir ve bakteri, virüs, mantar ve protozalara karşı etkinlik gösterirler. Bu peptidler iki grup olarak incelenebilir: defensinler (α ve β) ve kadhelisinler. Paneth hücrelerinden α -defensin salgılanması mikrobiyal uyarı sonrasında gerçekleşir, patolojik ve faydalı bakterilerin çoğalmasını kontrol etmede önemli bir rol üstlenir (58).

Antimikrobiyal peptidler intestinal proinflamatuvar ve sekretuar cevabı etkileyerek konakçı savunmasında yer alırlar. In vitro yapılan çalışmalarda, bu peptidlerin proinflamatuvar döngüyü sitokin salınımı ile başlattıklarını, sonuç olarak da bölgeye immün sistem hücrelerinin toplandığı gösterilmiştir. Antimikrobiyal peptidlerin bir başka etkisi de intestinal epitelden Cl^- sekresyonunu aktive etmektir (59). İntestinal epitelin tüm bu fonksiyonlarındaki olgunlaşmamaya bağlı yetersizlik intestinal hasara yol açıp bakterilerin barsak duvarında doku düzeyinde daha derin noktalara ulaşmalarına sebep olmaktadır (48).

İntestinal sistemin doğal bağışıklık mekanizmaları: Olgunlaşmamış intestinal sistem hasara, NEK patogenezinin son basamağı olduğu kabul edilen abartılı bir inflamatuvar yanıtla cevap vermektedir. Nekrotizan enterokolit patogenezinde yer alan inflamatuvar mediatörler; PAF, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 ve IL-18’dir. Konak potansiyel bir tehlikeye karşı ortama inflamatuvar ve kemotaktik ajanları salgılayarak geçirgenliği artırır ve inflamatuvar hücreleri bölgeye toplar. Pro ve anti-inflamatuvar ajanlar arasındaki dengesizlik intestinal hasara katkıda bulunur. Bölgeye gelen lökositlerden salınan proteaz ve oksidan maddeler de intestinal bariyerin hasarına sebep olmaktadır. Sonuç olarak da bu durum patojen ve patojen olmayan ajanların mukozaya ulaşmasına, proinflamatuvar kaskadın uyarılmasına ve daha çok doku hasarına yol açmaktadır. Diğer yandan ise yetersiz bir inflamatuvar yanıt bakterilerin çoğalmasına, apoptoza ve barsak epitel hücresinin ölümüne sebep olmaktadır. Konakçının sağlığı, aşırı bir proinflamatuvar ve yetersiz bir inflamatuvar yanıt arasındaki hassas dengeye bağlanmaktadır (43,47,48,59).



Şekil 2.3: Nekrotizan enterokolitin patogenezi.

İntestinal dolaşım regülasyonunda yetersiz olgunlaşma: Özellikle prematüre bebeklerin hastalığı olan NEK term bebeklerde daha nadir görülmektedir. Term bebeklerde NEK genelde belirli risk faktörleri ile ilişkili olarak görülmektedir. Bu risk faktörleri arasında konjenital kalp hastalığı, hipoksik-iskemik olay, polisitemi veya intrauterin büyüme geriliği öyküsü sayılmaktadır. Bunun yanı sıra, term NEK olgularında en sık tutulan bölge ileoçekal valv bölgesidir ki bu bölge kanlanma açısından “water-shed” alanıdır. Term bebeklerde yaşamın ilk birkaç gününde görülmesine rağmen, preterm bebeklerde daha geç dönemde görülmesi perinatal hipoksik olayların etkisini şüpheli kılmaktadır (47). Ancak özellikle son dönemlerde preterm bağırsağındaki vazodilatör ve vazokonstriktör mekanizmalar arasındaki denge üzerinde durulmaktadır. Yenidoğan bağırsaklarındaki dolaşımın en belirleyici özelliği endotelin 1 (ET-1)’e göre NO’nun daha fazla olması ve düşük vasküler rezistansın olmasıdır. Hipotansiyon varlığında akımın otoregülasyonunu sağlayamamaya doku hipoksisi oluşmakta, hipoksi vazokonstriktör ET-1’in üretimini artırarak NO salınımını bozmaktadır (56,60). Bunun dışında immatür bağırsağın metabolik ihtiyacının artmasına paralel kan akımındaki artışın yetersiz kalması dokunun oksijen ihtiyacının karşılanamamasına neden olmaktadır (61).

2.2.2.2. Enteral beslenme

Nekrotizan enterokolit vakalarının % 90-95'i beslenme başlanması, yeniden başlanması ya da hacim artırımları ile ilişkilidir. Eski literatürde NEK olguları ilk beslenmeden sonraki birkaç gün içerisinde görülürken, 1990'lardan sonra benimsenen trofik beslenme, minimal enteral beslenme ve kısıtlı miktarlarda günlük beslenme hacim artırma politikalarına bağlı olarak aşırı düşük doğum ağırlıklı bebeklerde haftalarca sonra karşımıza çıkan bir sorun haline gelmiştir (38).

Anne sütü yerine mama ile beslenme, mamanın hiperozmolar olması, hızlı hacim artışları beslenme ile ilgili en önemli risk faktörleridir. Enteral beslenme hacminde hızlı artışlar yapmak, bağırsağın metabolik ihtiyacını artırır, mezenterik kan akımı ihtiyaç doğrultusunda arttırılamazsa intestinal hipoksi oluşur (42).

Anne sütü, bebeğin bağışıklık sistemine olumlu katkıda bulunan çok çeşitli biyoaktif faktör içermektedir. Bunların başlıcaları sIgA, laktoferrin, lizozim, lökosit, musin, sitokinler, büyüme faktörleri, oligosakkaridler ve çoklu doymamış yağ asitleridir. Anne sütünün, mamaya olan üstünlüğü gözlemsel çalışmalarda çok net ortaya konmuştur (4,37,42,47). Ancak etik sorunlardan dolayı anne sütünün mama ile karşılaştırıldığı randomize kontrollü bir çalışma yapılamayacağı için NEK'i azaltma oranı belli değildir.

Erken trofik beslenme ile sindirim enzimleri, hormonları, intestinal kan akımı, motilite artarken, sepsis ve hastanede kalış azalır (62).

2.2.2.3. Anormal bakteriyel kolonizasyon

Bakterilerin NEK patogenezinde yeri olduğunun en önemli kanıtları; in utero steril olan bağırsaklarda NEK olmaması, enfeksiyon kontrol yöntemleri ile NEK'in engellenebilmesi, ileum ve proksimal kolon gibi en yüksek bakteri yükü olan bölgelerde görülmesi, NEK salgınlarında Clostridium, Klebsiella, Staph epidermidis, E.coli, Rotavirus gibi ajanların izole edilmiş olmasıdır (43,47,48). Doğumda steril olan yenidoğanın gastrointestinal sistemi (GIS) saatler içinde annenin vajinal florası ve çevrenin florası ile kolonize olmaktadır. Term bebekte 2 hafta içinde barsak florası bifidobakter ve fakültatif anaerobların ağırlıklı olduğu bir flora haline gelir

(63). Ancak YYBÜ'ne yatan, çok çeşitli antibiyotiklere maruz kalan preterm bebeklerin florası ağırlıklı olarak çoklu antibiyotik direnci olan mikroorganizmalar ile kolonizedir. Bu patojenik bakterilerle faydalı kommensal bakteriler arasında uygunsuz bir denge olması NEK patogeneğinde yer almaktadır. Kommensal bakteriler bariyer fonksiyonu, sindirim ve anjiogeneze için önemli genlerin ekspresyonunu regüle eder. In vitro çalışmalarda bu faydalı bakterilerin NF- κ B transkripsiyon faktörlerini inhibe etmek suretiyle kontrolsüz inflamatuvar yanıtı durdurabildiği gösterilmiştir(47,48).

Preterm bağırsağında yetersiz sindirim ve intestinal motilite nedeniyle durgunluk olması bakteriyel çoğalmaya neden olur, bu durumda patojenik olmayan bakteriler bile invaziv hale gelebilmektedir. Özellikle gram (-) bakteri duvarındaki LPS, inflamatuvar kaskadı NF- κ B üzerinden başlatır, salınan enzimlerle apoptoz başlanmaktadır (47).

2.2.2.4. Genetik Yatkınlık

Preterm doğum, RDS, BPD, sepsis, ROP için gösterilmiş bazı genetik polimorfizmler tespit edilmiştir. Son yıllarda NEK gelişimi ve ciddiyeti üzerinde etkili olabilecek genetik yatkınlık araştırmaları yapılmaktadır. Benzer risk faktörleri olan her bebeğin neden NEK olmadığını açıklayabilmek ve potansiyel riskli bebekleri belirleyip hedefe yönelik tedavi uygulanabilmesi için genetik araştırmalar devam etmektedir.

Dolaşım regülasyonunu etkileyen genetik varyasyonlar; vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), NO öncülü olan arginin sentezi için üre siklusunda hız belirleyici enzim olan karbomoyl fosfat sentaz 1 (CPS-1)'deki mutasyonlardır (48).

İnflamatuvar sinyal yollarını etkileyen genetik varyasyonlardan; IL-18 polimorfizmin ve Evre 3 NEK ile ilgisi, IL-4 reseptör α -zincir mutasyonunun ise koruyucu etkisi gösterilmiştir (48).

2.2.3. Tanı

Nekrotizan enterokolit tanısı hastadaki klinik, radyolojik ve laboratuvar bulgularının birlikte değerlendirilerek konulmaktadır.

2.2.3.1. Klinik Bulgular

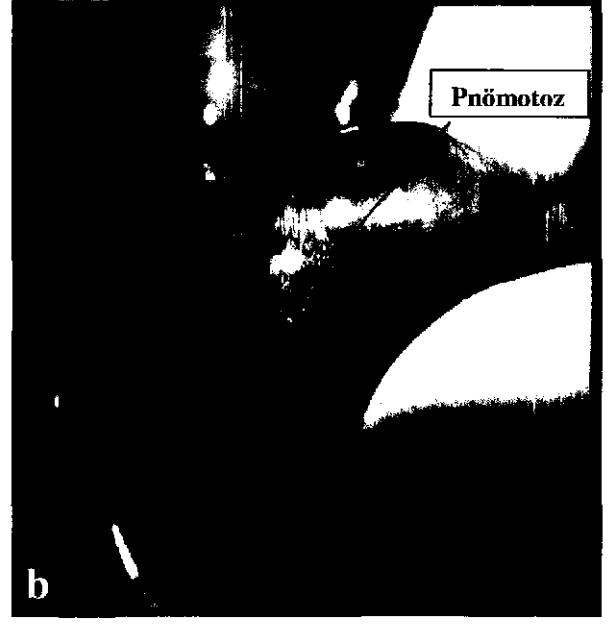
Hastalarda hafif beslenme intoleransından, ağır GIS bulgularına kadar varabilen çok geniş bir spektrumda klinik belirtiler görülebilir. İlk ortaya çıkan bulgular genellikle karında distansiyon, kusma, apne ve dolaşım bozukluğu gibi özgün değildir. Nekrotizan enterokolitin klinik bulguları Tablo 2.6'da özetlenmiştir (50,64).

Tablo 2.6: Nekrotizan enterokolitin klinik bulguları.

Gastrointestinal sistem bulguları	Batın distansiyonu, batında hassasiyet Azalmış bağırsak sesleri Beslenme intoleransı, kusma, gastrik rezidülerde artış Batın duvarında renk değişikliği, selülit Batında ele gelen kitle, asit Gaytada gizli veya aşık kan
Sistemik bulgular	Apne-Bradikardi, SaO ₂ 'de düşüklük Vücut ısı düzensizlikleri Letarji, huzursuzluk, emmede azalma Hipotansiyon, dolaşım bozukluğu

Gastrointestinal sistem bulguları; beslenme intoleransı, mide boşalma zamanında uzamaya bağlı gastrik rezidü, gaytada kan, ileus, batında kitle, abdominal duvarda eritem ya da endurasyon, lokalize abdominal kitle veya asittir. (Şekil 2.4.a) (Tablo 2.6) (50,64).

Sistemik bulgular arasında; solunum sıkıntısı, apne ve/veya bradikardi, huzursuzluk, vücut ısısında düzensizlik, azalmış periferik perfüzyon, zayıf emme, hipotansiyon, asidoz, hipoglisemi veya hiperglisemi, yaygın damar içi pıhtılaşmadır.



Şekil 2.4: Nekrotizan enterokolitli olgu fotoğrafları. **a)** Nekrotizan enterokolit gelişen bir bebekte batın bulguları, **b)** Nekrotizan enterokolitli bir olguda “pnömotozis intestinalis” görünümü

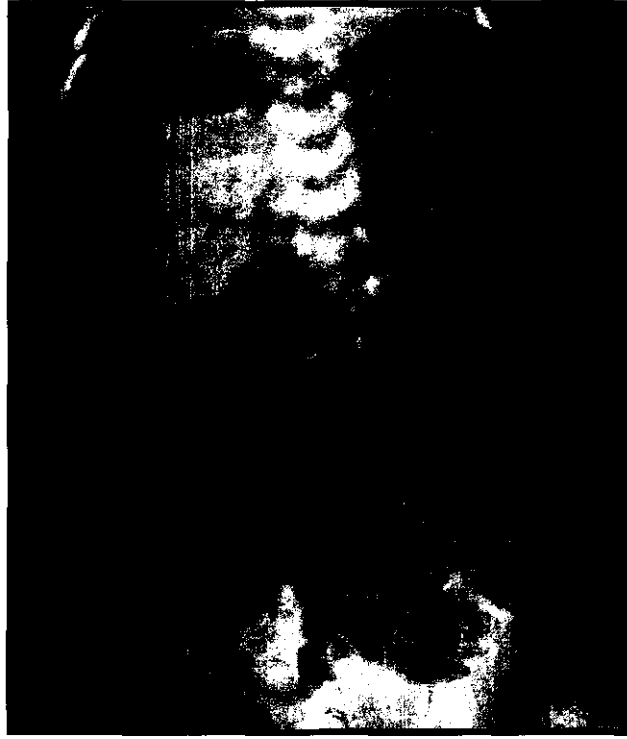
Tablo 2.7: Nekrotizan enterokolitin laboratuvar ve radyolojik bulguları.

Laboratuvar bulguları	Metabolik asidoz Trombositopeni Lökopeni veya lökositoz (çomaklarda artış) Hipoglisemi, hiperglisemi Hiponatremi PT, PTT ↑ CRP ↑
Radyolojik bulgular	Bağırsak segmentlerinde genişleme Genişlemiş, sebat eden barsak segmenti (nöbetçi ans) Bağırsak duvarında ödeme bağlı kalınlaşma Asit Pnömotozis intestinalis, portal venöz sistemde hava Batında serbest hava

2.2.3.2. Laboratuvar ve Radyolojik Bulgular

Nötropeni, trombositopeni, metabolik asidoz, enfeksiyon göstergelerinin pozitifleşmesi ve elektrolit bozukluklarından dirençli hiponatremi, pıhtılaşma parametrelerinde bozulma en sık görülen laboratuvar bulgularıdır (Tablo 2.7).

Radyolojik incelemede, erken dönemlerde bağırsaklarda distansiyon, sabit pozisyonda barsak segmenti “nöbetçi ans” ve bağırsak duvarında ödem görülürken, daha ileri evrelerde bağırsak duvarında (pnömotozis) ve portal veya hepatik vende gaz gölgeleri görülmektedir. Barsak perforasyonunda ise batında serbest hava görülür (Şekil 2.5) (Tablo 2.7) (64).



Şekil 2.5: Perforasyon sonrasında batın içinde serbest hava görülen ayakta direkt batın grafisi.

2.2.3.3. Evreleme

Günümüzde NEK evrelemesi için halen “Modifiye Bell Evrelemesi” ile kullanılmaktadır (Tablo 2.8) (41).

Tablo 2.8: Modifiye Bell evrelemesi.

Evre	Sistemik bulgular	Abdominal bulgular	Radyolojik bulgular	Tedavi
I A	Isı dengesizliği, apne, bradikardi, letarji	Rezidü, abdominal distansiyon, kusma, GGK +	Normal ya da bağırsak segmentlerinde dilatasyon, ileus	Ağızdan beslenme kesilir, 3 gün antibiyotik
I B	I A ile aynı	Gaytada kan +	I A ile aynı	I A ile aynı
II A	I A ile aynı	I B + bağırsak sesleri alınamaz, batın hassasiyeti +/-	Bağırsaklarda dilatasyon, ileus, pnömotozis intestinalis	Ağızdan beslenme kesilir, 7-10 gün antibiyotik
II B	I A + hafif metabolik asidoz, trombositopeni	II A + batında hassasiyet, batında selülit +/- sağ alt kadranda ele gelen kitle +/-	II A + Asit	Ağızdan beslenme kesilir, 14 gün antibiyotik
III A	II B + hipotansiyon, bradikardi, ciddi apne, miks asidoz, DIC, nötropeni	II B + peritonit bulguları, belirgin hassasiyet ve distansiyon	III A ile aynı	II B + sıvı desteği, inotrop, ventilasyon desteği, parasentez
III B	III A ile aynı	III A ile aynı	III A + batında serbest hava	III A + ameliyat

2.2.4. Tedavi

Tedavinin asıl amacı devam eden hasarı önlemek, komplikasyonları azaltmaktır. Nekrotizan enterokolitin evresine göre tedavi yaklaşımı sadece medikal olabileceği gibi ileri evrede medikal ve cerrahidir. Tanı konulduğu andan itibaren

ilerleme durdurulamazsa evre ilerleyerek cerrahi gerekliliği ortaya çıkmaktadır (50,63-65).

2.2.4.1. Tıbbi Tedavi

Nekrotizan enterokolit tanısı konan ve hatta şüphelenilen olgularda bile oral beslenmenin kesilmesi, midenin orogastrik sonda ile drenaja alınarak dekomprese edilmesi, parenteral beslenmenin başlanması, dolaşımı desteklemek için sıvı desteği sağlanması gerekmektedir.

Hastaların çok hızlı değişebilecek klinik ve vital bulguların yakın takibi ve gelişebilecek kardiyopulmoner yetmezliğin desteklenebilmesi için YYBÜ’de izlemleri gerekmektedir. İlk 2-3 gün 6-8 saat aralıklarla karın grafisi çekilmelidir.

Hastaya ünitenin direnç durumuna göre geniş spektrumlu antibiyotik kombinasyonu başlanması gerekir. Bu antibiyotik kombinasyonunda, gram (+) ve (-) organizmalara yönelik antibiyotiklere ek olarak, NEK patogenezinde yer alması muhtemel olan anaerob bakterilere yönelik metranidazol, klindamisin gibi bir antibiyotiğin bulunması gerekmektedir.

Hastanın ihtiyacı doğrultusunda ventilasyon desteği sağlanmalıdır. Tansiyon değerleri ve saatlik idrar çıkışı takibi ile doku perfüzyonu değerlendirilerek inotrop ihtiyacı karşılanmalıdır.

Metabolik asidoz varsa bikarbonat desteği, trombositopeni varsa trombosit suspansiyonu, oksijenizasyonu düzeltmek için eritrosit suspansiyonu, gerekiyorsa taze donmuş plazma verilmeli, elektrolit bozuklukları tedavi edilmelidir (50,63-65).

2.2.4.2. Cerrahi Tedavi

Nekrotizan enterokolitli bebeklerin cerrahi girişim endikasyonları; karın duvarında artan kızarıklık, sağ alt kadranda ele gelen kitle, perforasyon (serbest hava), tüm barsak duvarı nekrozu, tıbbi tedaviye yanıt alınamaması olarak sıralanmaktadır. Cerrahi zamanlaması mortalite ve morbidite açısından çok önemlidir. Hipotansiyon, şok bulguları, anüri, metabolik asidoz, ciddi

trombositopeni, koagulopati geliştikten sonra yapılan cerrahi daha risklidir ve daha fazla barsak segmentinin kaybı ile sonuçlanmaktadır (50,63-65).

2.2.5. Prognoz

Preterm bebeklerde NEK mortalitenin önemli sebeplerindendir. Özellikle daha küçük ve hastalığın daha ileri evrelerindeki hastalarda mortalite oranları daha yüksektir. Medikal tedavi, tanıda pnömotozis intestinalis bulgusu olan hastaların % 20-40'ında başarısızdır ve bunların % 10-30'u kaybedilir. Ölüm dışında, NEK ciddi morbiditelere sebep olur. Ameliyat sonrası erken dönem komplikasyonlar arasında yara yeri enfeksiyonu, açılma, prolaps ve nekroz gibi stoma komplikasyonları görülür. Geç dönem komplikasyonlar olarak ise intestinal darlık, kısa barsak sendromu (malabsorbsiyon, büyüme geriliği, malnutrisyon), kolestazdır (49,65).

Uzun dönem GIS morbiditelerine ek olarak NEK geçiren bebeklerde nörolojik ve nörogelişimsel problemler görülmektedir. Özellikle cerrahi gerektiren NEK geçiren prematürelere, medikal tedavi edilebilen NEK'li prematüre ve tüm prematürelere göre daha fazla nörolojik sekel görülür. 7843 aşırı düşük doğum ağırlıklı bebekte yapılan bir çalışmada; 821 hastanın NEK tanısı aldığı, ortalama 20. ayda yapılan değerlendirmede bunların % 45'inde nörogelişimsel geriliğin görüldüğü ve bunun benzer yaş grubunda olan ancak NEK geçirmeyen gruptaki % 35'e göre anlamlı yüksek olduğu bulunmuştur. Nekrotizan enterokolitli grubun % 20'sinde serebral palsi, % 36'sında bilişsel gerilik, % 3'ünde de görme veya işitme kaybı olduğu tespit edilmiştir (66).

2.2.6. Nekrotizan Enterokoliti Engelleme

En sık görülen GIS acili olması, mortalitesinin ve uzun dönem komplikasyonları göz önüne alındığında, NEK'in önlenmesi çok daha önemlidir ve bilimsel araştırmalar bu yönde yoğunlaşmıştır. Prenatal ve postnatal dönemde alınabilecek önlemlerle NEK azaltılmaya çalışılmaktadır.

Antenatal kortikosteroid: Preterm doğum riski olan annelere yapılan ANS'nin NEK insidansını azalttığı gösterilmiştir. Kortikosteroidlerin akciğer maturasyonu

üzerine olumlu etkilerine benzer şekilde GIS'i de olgunlaştırıcı etkisi vardır. Muhtemelen bağırsak bariyeri güçlenmekte, bakteri ve bakteri translokasyonu engellenmektedir (50). Roberts ve Dalziel'in yaptıkları metaanalizde ANS'nin NEK riskini 0,46 kat azalttığı gösterilmiştir (67).

Trofik beslenme: Trofik, “beslenme amaçlı olmayan” beslenme, GIS motilitesini uyarır ve sindirim için gerekli enzim aktivitesini uyarmaktadır. Berseth ve ark 2003 yılında trofik beslenmenin NEK insidansını azalttığını gösterdiğinden beri tüm dünyada preterm bebeklerin ne kadar küçük olurlarsa olsunlar doğum sonrasında anne sütü ile beslenmeye başlanması benimsenmiştir (68).

Anne sütü: Anne sütü içeriği, sindirimi kolaylaştırır, koruyucu bakterilerin çoğalmasını destekler ve GIS mukozal bariyerini korur. Anne sütü ile beslenen bebeklerle mama ile beslenen bebekler arasında GIS florası açısından belirgin fark bulunmaktadır. Mama ile beslenenlerde Clostridia, Enterobacter, Enterokoklar görülürken, AS alanlarda Bifidobakter ağırlıklı olarak bulunmaktadır. 90'lı yıllarda yapılan bir çalışmada mama ile beslenenlerde altı kat daha fazla NEK görüldüğü bildirilmiştir (42,50). Sisk ve ark, yaşamın ilk 14 gününde beslenme hacminin $\geq$ % 50'sinin AS olmasının NEK'e karşı koruyucu olduğunu göstermişlerdir (69).

Oral antibakteriyel: Nekrotizan enterokolit patogenezinde patojen bakterilerin bulunması oral antibakteriyellerin kullanımını gündeme getirmiştir. Bu amaçla vankomisin ve gentamisinle yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (50). Yapılan bir metaanalizde gentamisinin NEK insidansını, NEK' e bağlı mortaliteyi azalttığı, ancak aynı zamanda dirençli bakterilerle kolonizasyonun da arttığı gösterilmiştir (70). Potansiyel olarak faydalı görünmesine rağmen, NEK patogenezinde adı geçen her mikroorganizmaya yönelik tek bir antibiyotik verilemeyeceği ve profilaktik antibiyotik kullanımının dirençli mikroorganizmalara sebep olma ihtimali nedeniyle oral antibiyotik verilmesi benimsenmemiştir (50).

Probiyotikler: Oral olarak alınan, içinde konakçının GIS'ndeki florayı değiştirebilecek yeterli sayıda canlı mikroorganizma bulunduran, potansiyel olumlu etkileri olabilecek gıda katkısı ya da yiyecektir. Nekrotizan enterokolit gelişen hastaların bağırsaklarından sadece patojen mikroorganizmaların tespit edilmesi ve NEK için risk grubu olan ÇDDA'lı bebeklerde yaygın geniş spektrumlu antibiyotik kullanımına bağlı GIS'in normal florasının oluşamaması, ÇDDA'lı bebeklerde

NEK'in engellenmesi için probiyotik kullanımını gündeme getirmiştir. Son 10 yılda özellikle ÇDDA bebeklerde olmak üzere çok sayıda probiyotik çalışması yapılmıştır. 2008 yılında çıkan Cochrane metat analizinde, 1000-1500 g için probiyotik kullanımının güvenli, NEK'i engellemede etkin, sepsis üzerine etkisiz bulunması nedeniyle klasik pratiğin değiştirilmesi ve probiyotik kullanımının yaygınlaşması önerilmiştir (71). 2010 yılındaki bir metaanalizde ise bu konuda yeterli çalışma olduğu için artık yeni bir probiyotik olmaksızın yeni bir çalışma yapmanın gereksiz olduğu belirtilmiştir (72). Ancak hangi probiyotiğin kullanılacağı net değildir, ve yapılan metaanalizlerdeki çalışmalar tek bir probiyotik ve tek bir protokol çerçevesinde olmadığı için bütün çalışmaların olumlu sonuçlarını tek bir havuzda toplayarak, özellikle <1000 g bebekler için öneride bulunmak doğru değildir. Ancak ortak protokolle, çok merkezli, randomize, çift kör yapılacak bir çalışma sonrasında rutin kullanımı önerilebilecektir (3).

Prebiyotik: Sindirilemeyen ancak GIS'de faydalı mikroorganizmaların gelişimini ve aktivitesini uyaran besin içeriğidir. İnulin, galaktoz, fruktoz, laktuloz ve bunların kombinasyonlarının kullanılmasının bifidobakter gibi bakterilerin gelişimini destekleyerek NEK'i engelleyebileceği düşünülmektedir. Ancak bu özellikle uygun florası oluşmamış ÇDDA bebeklerde tek başına kullanımının faydasız olacağını düşündürmektedir (3).

2.3. Yenidoğanın İmmün Sistemi

Doğum, bebeğin annesine bağımlılığından kurtulup, tek başına yaşamın başladığı fizyolojik bir olaydır. Yenidoğan steril intrauterin çevreden çıkarak, sayısız mikrobun ve antijenin bulunduğu yeryüzü ile karşılaşır ancak hayatta kalabilmesi için yeterli sayıda immün mekanizma ile donatılmıştır.

Konakçının savunma mekanizmalarına göre immün sistem, doğal ve edinsel immün sistem olarak incelenebilir:

Doğal immün sistem mikroorganizma ya da antijenleri ile önceden bir karşılaşma olmaksızın konakçıyı savunan immün sistem elemanlarıdır. Bunların içinde fiziki bariyer oluşturan bütünlüğü bozulmamış cilt, mukozal yüzeyler, kimyasal bariyer oluşturan mide asidi ve sindirim enzimleri, bu katmanların altında

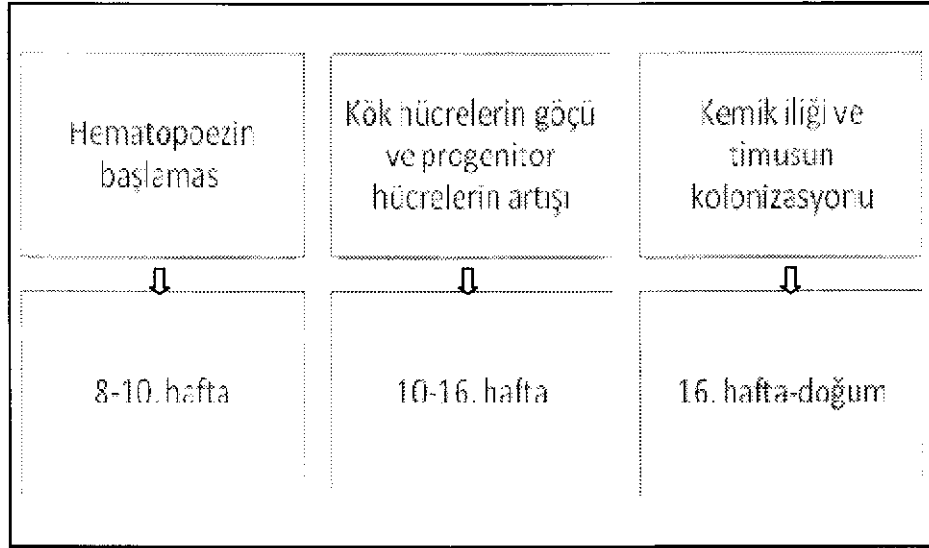
yer alan fagositik hücreler ve bu hücrelerin fonksiyonlarını arttıran plazma ve doku proteinleri yer almaktadır.

Edinsel immün sistem ise hücre aracılı (T lenfositler) ve humoral (B lenfositler ve antikorlar) sistemleri içermektedir. Her iki sistem birbirleri ile bağlantılı ve bağımlıdır (73,74).

İmmün yanıtın olgunlaşması çok çeşitli yabancı antijenik materyalle karşılaşma sonrasında oluşan kümülatif bir repertuarla oluşmaktadır. Uterus içinde birçok antijen maruziyetinden korunan fetus ise doğumda tecrübesiz bir konakçı savunma sistemi ile dünyaya gelmektedir. Bu, özellikle ilk 6 haftadaki mikrobiyal ataklara karşı hassasiyetin sebeplerindendir (36,74).

2.3.1. Fetal İmmün Sistemin Gelişimi

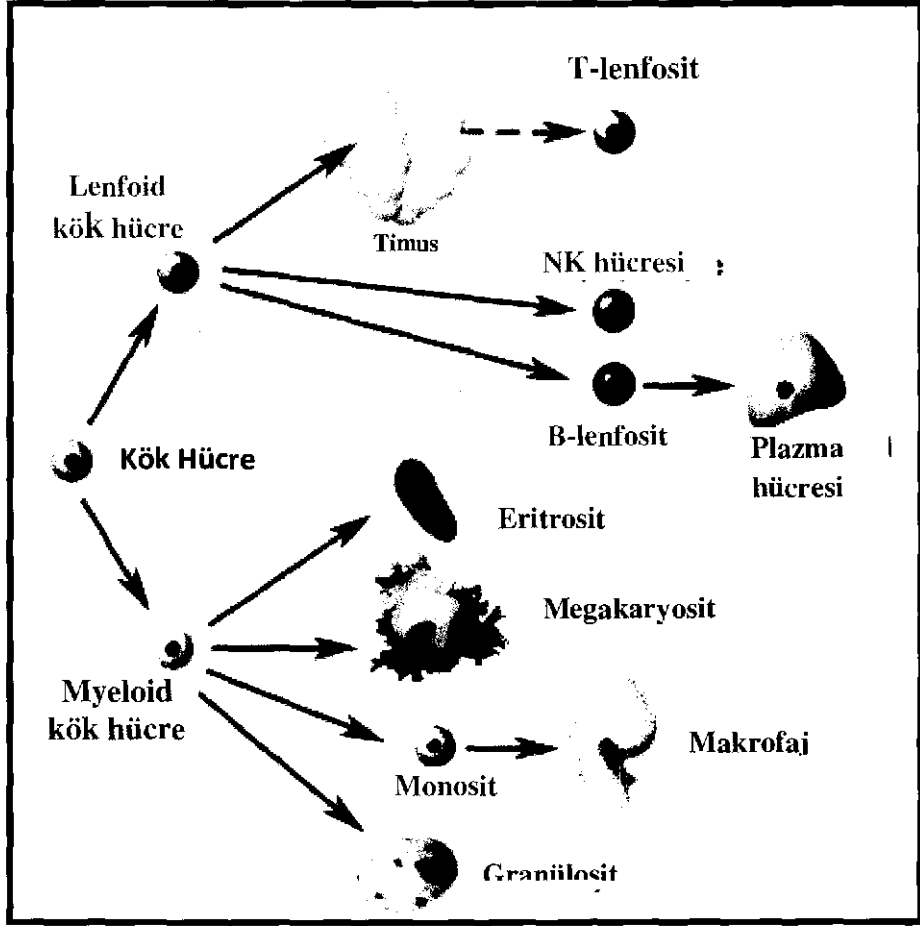
İmmün sistemde rol alan hücreler, fetusun yolk kesesindeki kök hücrelerden kaynaklanan hematopoetik progenitor hücrelerden gelişir (36).



Şekil 2.6: Fetal immün sisteminin gebelik dönemindeki gelişimi.

Gelişmekte olan fetusta, yolk kesesinde ilk saptanan gestasyonun 4. haftasından itibaren makrofajlardır. Daha sonra fetal karaciğerde erişkin tip makrofajlar ortaya çıkar (Şekil 2.6). Gestasyonun 6. haftasında karaciğerde doğal

öldürücü (NK) hücreler ortaya çıkar. Nötrofil öncülleri yolk kesesinde gösterilmiştir ancak 14. gestasyon haftasına kadar fetal karaciğer ya da kemik iliğinde bulunmaz. Dolaşımda matür nötrofillerin görülmesi ise gestasyonun 14-16. haftalarında olur. Term doğumlarda kord kanında bulunan PMN'lerin ancak % 2'si 22-23 haftalık fetusta dolaşımda bulunmaktadır (73-75).



Şekil 2.7: İmmün sistem hücrelerinin progenitor hücrelerden gelişimi.

T-hücre öncülleri gebeliğin 8. haftasında karaciğerde saptanabilir. Bu kök hücreler timusa 8. haftada ulaştıktan sonra, 9. haftada timositler görülmeye başlanır. Gestasyonun 14. haftasında timus içinde hücrelerin kompartmanlara ayrılması meydana gelir. İkinci trimestrdan başlayarak, fetal dolaşımdaki T hücreleri gebelik boyunca giderek artar. Miadında doğan bebekte periferik kandaki total lökositlerin ¼'ü T hücreleridir ve CD4:CD8 oranları erişkindeki ile paralel şekilde 1,2:1 ve 2:1

arasında değişir. B hücrelerinin gelişimi de T hücrelerine paralel bir yol izler. B lenfositlerinin olgunlaşması iki basamakta gerçekleşir: Birinci basamakta; farklılaşmamış kök hücreden B lenfosit  dönüşüm fetal karaciğer ve kemik iliğinde antijenden bağımsız şekilde gerçekleşir. Yüzeyinde sadece Ig M eksprese edebilen immatür B hücreleri 8-9. haftada, Ig G ve Ig A sentezleyebilenler ise 12. haftada tespit edilebilir. Dokulardaki B hücreleri 2. trimestrda hızla artar ve gebeliğin ortalarında dalakta ve kemik iliğindeki B hücrelerinin oranı, erişkindeki oranlara ulaşır. İkinci basamak ise antijen bağımlıdır ve B lenfositler bu aşamada tek bir yüzey Ig'ı taşırlar, sonradan da plazma hücrelerine d n ş rl r (36,73,74,76).

Özetle, fetal gelişim sırasında immün sistem, birçok erişkin özelliğini kazanır. Hücresel immün sistemin bütün komponentleri gestasyonun erken evrelerinde ortaya çıkar ve birçok patojene karşı cevap verebilecek düzeydedir. Doğumdan önce plasentadan geçen, doğum sonrası ise anne sütünden geçen immunglobulinler de yenidoğanın immün kapasitesini destekler (6).

2.3.2. Doğal İmmün Sistem

2.3.2.1. Polimorfonukleer Nötrofil Sistemi

Yenidoğanlardaki nötrofil havuzu erişkinin 1/10'u kadardır, ancak proliferasyon hızlı, turnover % 75-80 civarındadır. Kandaki granülosit havuzunun yarısı dolaşır halde iken yarısı damar endoteline yapışık haldedir. Dolaşan nötrofillerin yarı ömrü 7-8 saat iken dokuya geçenlerin 24 saattir (73,75).

Doğumdan sonraki 12-24. saatlerde dolaşımdaki PMN konsantrasyonunda dramatik bir artış görülür, ancak 72. saat itibari ile sabit kalacağı seviyelere iner. Enfeksiyon sırasında dolaşan nötrofiller dokuya geçerken, kemik iliğindeki nötrofiller, immat rl r de dahil olmak üzere dolaşıma katılır. Gestasyon yaşı 32 haftadan küçük prematürelerin nötrofil havuzu termilerin % 20'si kadardır (36,75).

Polimorfonükleer Nötrofil Fonksiyonları: Konakçı savunmasının sayısal ve özellik olarak en efektif fagositleri PMN'lerdir. Mikrobiyal invazyonun olduğu dokuya çok sayıda PMN'nin birikmesi, basamaklar sonrasında gerçekleşebilmektedir; önce damar endoteline yapışması, deforme olabilmesi,

dokuya geçebilmesi (kemotaksi), fagositoz yapıp mikrobu öldürmesi gerekmektedir (13,73-75). Nötrofillerin yenidoğanlardaki yetersizlikleri Tablo 2.9'da özetlenmiştir.

Makrofajlar ve PMN'ler tarafından mikroorganizmaların algılanması yüzeylerinde bulunan, bakteri, virüs, mantarlara özgü moleküllere spesifik Toll-like reseptörler (TLR) aracılığı ile olur. Mikroorganizmaya yapışan TLR, fagositten endotel hücrelerini etkileyecek inflamatuvar mediatörler salınmasına ve dolaşımdaki PMN'lerin bu bölgedeki endotele yapışmasına sebep olur. Lökositlerin endotele yaklaşmasını sağlayan L-selektin doğumdan sonraki özellikle ilk 24 saat içinde olmak üzere ilk ayda düşüktür. Lökositlerin endotele sıkıca yapışmasını sağlayan faktörlerden en önemli adhesin reseptörü kompleman reseptörü 3 (CR3)'dür ve yenidoğanlardaki konsantrasyonu gestasyonel yaşla artarak doğumda erişkinin % 60'ı seviyesine ulaşır (36,73-75).

Sonraki aşama; nötrofilin endotel hücreleri arasındaki açıklıklardan tam gelişmiş kontraktil sistem ile sıkışarak ve şekil değiştirerek dokuya geçmesidir ancak yenidoğan nötrofilleri sert ve deformasyon kapasiteleri yetersizdir.

Fagositik hücrelerin kemoatraktan maddelere doğru hareketi için kullanılan C5a reseptörleri yenidoğan nötrofillerinde yetersizdir. Oponizasyon ve fagositozun başlayabilmesi için gerekli olan Ig Fc reseptörleri ve kompleman reseptörlerinin (CR) term bebeklerde yeterli iken preterm bebeklerde düşük oluşu, konak savunmasını bozmaktadır (36,73-75). Bu nedenle IV Ig verilmesinden sonra fagositoz artmaktadır.

Nötrofillerdeki primer granüllerde elastaz, myeloperoksidaz, lizozimler, defensinler ve bakteriyel geçirgenlik artırıcı protein, ikincil veya spesifik granüllerde ise zar reseptörleri ile lizozim, kollojenaz ve laktoferrin bulunur. Normal şartlarda yenidoğan fagositleri içindeki granül miktarı erişkindekilerle aynıdır. Ancak sepsis, MAS, RDS gibi durumlarda bakterisidal aktivite düşer. Yenidoğanlarda, lizozim, elastaz ve myeloperoksidaz atılımı erişkindekilere benzerken, laktoferrin atılımı düşüktür (13,73-75).

Fagositoz sırasındaki "respiratuar burst" denilen solunum patlamasında ortaya çıkan toksik oksijen ürünleri, mikrobisidal aktivite için önemlidir ancak yenidoğanda stres yaratan durumlarda solunum patlaması yeteri kadar yapılamaz (73-75).

Tablo 2.9: Polimorfontükleer nötrofillerin işlevleri ve yenidoğandaki yetersizlikleri.

PMN işlev	Yenidoğan PMN'lerinde yetersizlik
Dolaşımdaki PMN'lerin inflamasyon bölgesindeki endotele yapışması (endoteldeki selektinler ve PMN'deki adhesinler aracılığı ile)	Selektin düzeyi düşük Kompleman reseptör 3 (CR 3) düşük
Endotel hücreleri arasından dokuya geçer	Sert, deformasyon kapasitesi yetersiz
Kemotaksi (C5a reseptörleri aracılığı ile kalsiyum kullanılarak)	C5a reseptörleri yetersiz Hücre içi Ca^{+2} düzeyleri düşük
Oponizasyon (Ig Fc reseptörleri ve kompleman reseptörleri aracılığı ile)	Pretermde reseptör sayıları yetersiz
Granüllerden antimikrobiyal peptid ve enzim salgılar	Sağlıklı yenidoğanda granül sayı ve içeriği normal (Sepsis, RDS, MAS, asfiksi durumunda yetersiz)
Fagositoz, solunum patlaması	Sağlıklı yenidoğanda normal (Fetal asidoz, fetal asfikside yetersiz)

2.3.2.2. Monositler ve Makrofajlar

Mononükleer fagositik sistem, monositler ve doku makrofajlarından oluşur. Bu hücreler mikrobisidal aktivitelerinin yanı sıra sitokin, büyüme faktörleri, eikosanoidler, enzimler, enzim inhibitörleri, pıhtılaşma faktörleri, kompleman, plazma bağlayıcı proteinler, düşük molekül ağırlıklı oksijen radikalleri ve nitrojen ürünlerini salgırlar. Bakteri proteinleri, komplemanlar, fibrinopeptidler, değişik sitokinler, IL-1, TNF, IL-2 gibi faktörlerle uyarılması durumunda monositler dolaşımdan çıkarak inflamasyon bölgesinde birikir. Yenidoğanlarda antibakteriyel kapasiteleri erişkine benzer olmakla birlikte, yetersiz sitokin üretimi nedeniyle enfeksiyonları sınırlamada yetersizdir (13,36,74,77).

2.3.2.3. NK hücreleri

NK hücreleri antiviral immünitede rol oynayan lenfositlerdir. Yüzeylerinde CD16 ve Fc reseptörü taşırlar. NK hücreleri T hücrelerine benzemekle beraber, yüzeylerinde TCR taşımazlar ve gelişmeleri için timus, hedef hücrede lizis yapmaları için de MHC antijenlerine gerek yoktur. Hedef hücre yüzeyinde antijen-antikor

kompleksi varsa, CD 16 ile bu hücelere bağlanarak hücre lizisine yol açarlar. Özellikle herpesvirüsler ile toksoplazma ve listeria gibi intraselüler patojenlerin kontrol altına alınmasında önemli rol oynarlar. NK hüceleri, antijene özgü T hüceleri gelişmeden önce IFN- γ , TNF- α ve GM-CSF gibi sitokinlerin salınmasını uyarır. NK hücellerinden üretilen IFN- γ yardımı ile deneyimsiz CD4 T hücelerinin Th1 hüceleri şekline dönüşmesi kolaylaşır. Ayrıca NK hüceler dendritik hüceleri de aktive ederek bu hücelerden CD86, IL-12, TNF- α salınmasını ve T hücelerinin aktive olmasını sağlarken, dendritik hüceler de NK hücelelerini aktive ederek sitotoksik etki göstermelerini sağlar (73,74,76,91).

2.3.2.4. Kompleman Sistemi

Enfeksiyonlara karşı geliştirilen direncin önemli bir unsurudur ve eksikliğinde yenidoğanların enfeksiyonlara eğilimi artar. Kompleman komponentleri anneden fetusa geçmez, fetusta 20. haftadan itibaren fibroblastlar, lenfoid hüceler ve makrofajlar içinde sentezlenir. Doğumdan sonra bakterilerle karşılaşılması ve bakterilerin fagositozu, kompleman sistemin elemanlarının yapımını artırır. Komplemanların opsonizasyon, immün yapışma, viral nötralizasyon, anafilaktik ve kemotaktik faktörlerin yapılması ile hücre membran hasarının gelişmesi gibi etkilerinde ilk 5 komponent rol oynar. Bu maddelerin hepsi fetus ve yenidoğanda yapılmakla beraber miktarları doğumda gerek preterm, gerekse term bebeklerde yetersiz olduğundan immünolojik fonksiyonlar etkilenir (73,74,92).

2.3.2.5. Fibronektin ve adhezyon molekülleri:

Fibronektin, fibrin, trombositler, immün kompleksler ve kollajen artıklarının temizlenmesini sağlayan bir glikoproteindir. Birçok hücre yüzeyinde çözülmez halde, plazma ve interstisyel sıvılarda ise çözülür halde bulunan non-immün bir opsonindir. Yenidoğanlardaki fibronektin düzeyi, erişkindekilerin yarısı kadardır. Prematürelerde ve bazı patolojik durumlarda (sepsis, malnutrisyon, RDS, asfiksi gibi) bu düzeyler daha da düşer. Fibronektin düzeylerinin düşük olması, fagositik hücre fonksiyonlarının bozulmasına yol açarak, sepsise zemin hazırlar (73,75).

Adhezyon molekülleri ise, hücreler arası veya hücreler ile matriks arası birleşmeleri düzenleyen glikoproteinlerdir. Yenidoğanlarda görülen yetersiz inflamatuvar yanıtta, yetersiz sitokin üretimi ile birlikte yetersiz adhezyon molekülerinin bulunması da önemli rol oynar (73).

2.3.2.6. Sitokinler

Lenfositler ve makrofajlar başta olmak üzere birçok hücreden salınan ve sistemik immün ve inflamatuvar yanıtlarda mediatör olarak görev alan, glikoprotein yapısında hormona benzer maddelerdir.

Yenidoğanlarda, enfeksiyonlara zemin hazırlaması açısından IFN- γ ve TNF- α eksiklikleri önemlidir. T hücre fonksiyonlarının immatür olmasından dolayı, antiviral etkilere sahip, NK hücreleri, PMNL ve makrofajların antimikrobiyal fonksiyonlarını arttıran IFN- γ üretimi, erişkine kıyasla 10 kat daha düşüktür.

IL-12, NK ve T hücrelerinin fonksiyonları için çok önemli bir sitokindir. Yenidoğanlarda; IL-12 düzeyi, CD4+, CD8+ T hücreleri ve B hücrelerinde IL-2 ve TNF reseptörleri; CD4+ T hücrelerinde IL-6, IL-7; CD8+ T hücrelerinde IFN- γ ; B hücrelerinde ise IL-4 düzeyleri düşüktür (73,76).

Yenidoğanlardaki T hücrelerinin sitokine yanıtı genellikle düşüktür. Yenidoğan T hücrelerinin IFN- γ ve IL-4 üretememelerinin temel nedeni bunların üretiminden sorumlu mRNA içeren hücrelerin hiç bulunmamasıdır. Bu da yenidoğan T hücrelerinin deneyimsiz durumda olduğunu göstermektedir (76).

2.3.2.7. Antimikrobiyal peptidler

Yenidoğanlarda doğal bağışıklığı sağlayan antimikrobiyal peptidler de bulunmaktadır. Bu peptidler defensinler ve katelesidinler olmak üzere iki grupta incelenir. Defensinler de α ve β defensinler olarak iki alt gruba ayrılır. Altı tane α -defensin'in dördü nötrofillerde ikisi ise bağırsaktaki "Paneth hücrelerinde" bulunur. İntestinal paneth hücrelerinden 17. haftadan itibaren salgılanmaya başlar ve NEK'lilerde hem defensinlerin miktarı, hem de paneth hücrelerinin sayısında artış

saptanır (54,58,59). Dört β -defensin'in hepsi deri, GIS, ürogenital sistem ve solunum sistemi epitel hücrelerinde, böbrek, plasentada, AS'de bulunur (73).

Katelisidinler ise katelidin denilen sabit bölge ile antibakteriyel özelliklere sahip değişken bir C-terminalinden oluşur. Bu değişken bölge enzimler tarafından ayrıştırıldığında aktif antimikrobiyal peptid ortaya çıkar. İnsanlarda bulunan tek kadhelisidin LL-37 olarak adlandırılır (93). Tüm epitel hücrelerinde, nötrofiller ve özgün mononükleer hücrelerde bulunur ve laktoferrin ve lizozimlerle sinerjistik etki gösterir (94). Derideki antimikrobiyal dirençte LL-37 ve β -defensinler önemli rol oynar. "Verniks caseosa" içinde de α -defensin, lizozim, LL-37 ve psoriasin gibi antimikrobiyal peptidler bulunur (95). Solunum yolu epitelinde bulunan β -defensinler ve LL-37, akciğer enfeksiyonlarına karşı koruyucu rol oynarlar (94).

Antimikrobiyal peptidler, katyonik özellikte oldukları için, mikroorganizmaların membranlarındaki negatif yüklü fosfolipidlerle birleşir, hidrofobik özellikleri ile membrana entegre olur ve membranın stabilitesini bozarak bakterinin lizisine yol açar. Konakçı hücrelerin membranlarında negatif yük bulunmadığı için bu hücrelere herhangi bir zarar veremez (93,94).

Antimikrobiyal peptidler, doğrudan antimikrobiyal etki göstermelerinin yanı sıra; nötrofilleri ve T hücrelerini inflamasyon bölgesine toplar, pro ve anti-inflamatuar faktörlerin salınımını uyarır, nötrofillerin mikroorganizmalara adherensini ve non-opsonik fagositozunu, enfekte konakçı hücrelerin apoptoza uğramasını sağlarlar (73).

2.3.3. Edinsel İmmün Sistem

Bu sistem, insanları, enfeksiyöz organizmaların saldırısından korumak amacıyla çalışır ve bu nedenle, bir taraftan kendi vücut antijenlerini tanıırken, bir taraftan da yabancı antijene karşı yanıt vermek durumunda kalır. T ve B hücrelerinin tam olarak aktive olabilmek için en az iki tane uyarı almaları gerekir. İmmün yanıt sırasında, antijene özgü T ve B hücreleri çoğalarak efektör hücreler haline gelirler. Antijen ortadan kaldırıldıktan sonra, bu hücrelerin büyük bir kısmı yok olurken, küçük bir kısmı hafıza hücreleri olarak kalır. Antijenle yeniden karşılaştıklarında, bu

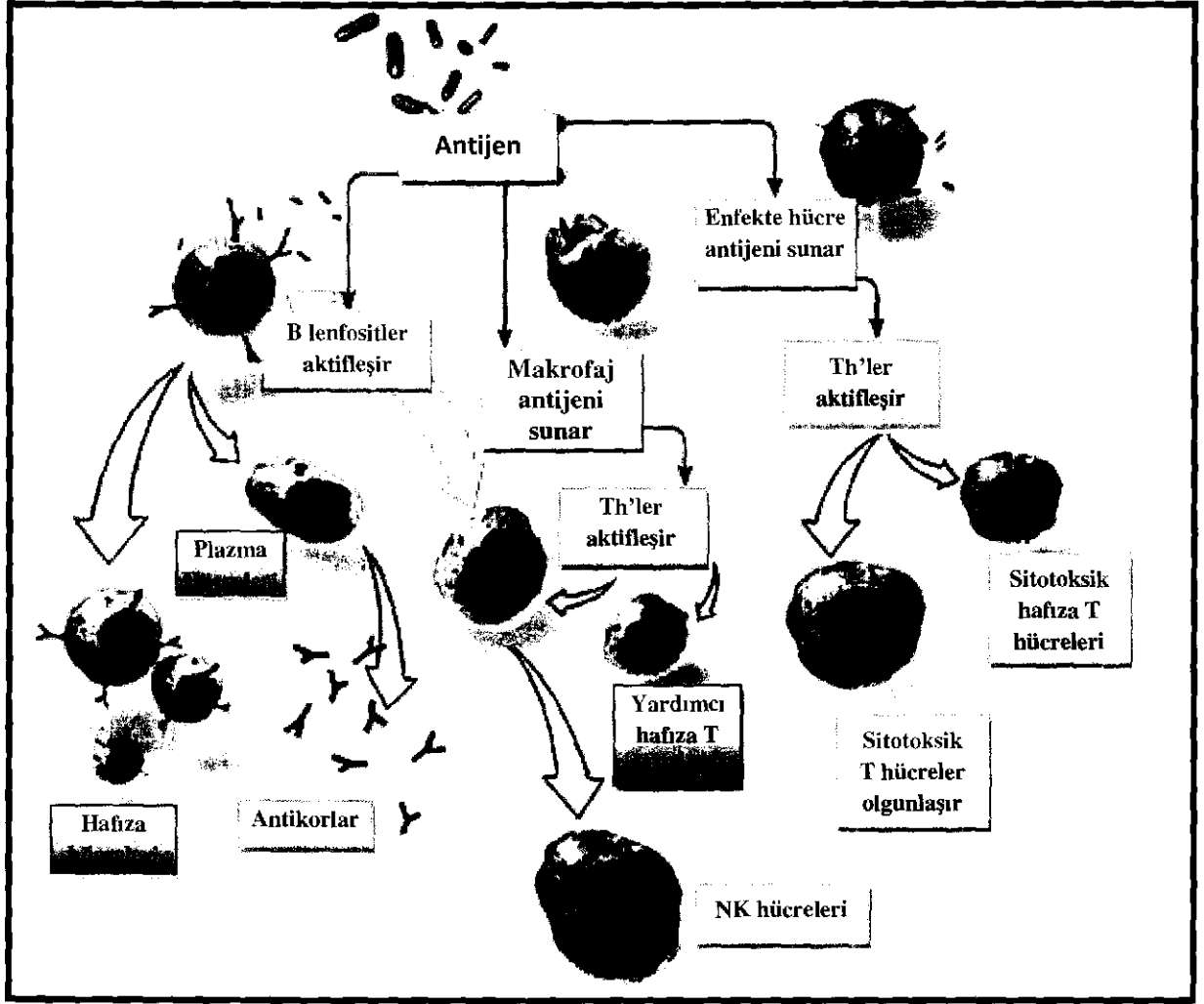
hücreler hızlı bir şekilde yanıt vererek tekrar çoğalmaya başlar. Bu yanıtlar, ilk yanıtlardan daha hızlı ve güçlüdür (73,74,76).

İmmün yanıt, antijen sunucu hücrenin yabancı bir antijeni yakalaması, peptid parçalara ayırıp spesifik reseptör taşıyan bir T hücresine sunması ile başlar. Bu ilk uyarıdır ve T hücresini kısmen aktive eder. Antijen sunucu hücreler, dendritik hücreler, B hücreleri, makrofaj/monosit ailesinden hücrelerdir. Sunulabilmesi için peptidin mutlaka hücre yüzeyinde bir MHC molekülüne bağlı olması gerekir. Ekstraselüler antijenler genellikle CD4+ T hücrelerindeki MHC Klas II molekülüne bağlanırken, intraselüler antijenler ise genellikle CD8+ T hücrelerindeki MHC klas I molekülüne bağlanırlar. Antijen sunucu hücreler, T hücre yüzeyi ile reaksiyona girdiğinde 2. uyarı ortaya çıkmış olur ve T hücre aktive olmuş olur. Antijen sunucu hücreler, bakteriyel liposakkaritler gibi bir uyarı ile karşılaştığı zaman 2. uyarı yapım hızını artırır (73,74,76).

B lenfositleri, antijene özgü reseptörler ile birleşince 1. uyarı ortaya çıkar ve yardımcı T hücresinden 2. uyarı aldıkları zaman da tam olarak aktive olur. Bunun olabilmesi için, B hücresi antijeni almalı, işlemeli ve peptidleri CD4+ T hücresine sunmalıdır (76). T ve B lenfositler arasındaki ilişki şematik olarak Şekil 2.8'de anlatılmaktadır.

2.3.3.1. T-lenfositler

T hücrelerinin yüzeyinde T-hücre reseptörü (TCR) bulunur ve yüzeylerinde bulunan değişik proteinlere göre, CD numaralarını alırlar ve temel olarak CD4 ve CD8 ekspresyonuna göre ikiye ayrılırlar. Yüzeyinde CD8 taşıyan hücreler sitotoksik T lenfosit olarak adlandırılır ve virüslerle enfekte olan hücrelerin öldürülmesinde rol alırlar. Yüzeylerinde CD4 taşıyan hücreler ise yardımcı T hücresi olarak adlandırılır ve gerek sitokin salgılayarak gerekse de CD8+ hücrelere ve B hücrelere uyarılar göndererek immün sistemin organizasyonunu sağlarlar. Sekrete ettikleri sitokinlere göre yardımcı T hücreleri Th1 ve Th2 olarak ikiye ayrılırlar. Th1'ler esas olarak mononükleer fagositlere, Th2'ler ise B lenfositlerin çoğalmasını ve farklılaşmasını uyarırlar (74,76) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8: T ve B lenfositler arasındaki ilişki.

Reglatuvar T hücreleri (Treg): İmmün sistem kendi homeostatik dengesini kurmak ve korumak için çeşitli yollar geliştirmiştir. Bu denge içinde konağın kendine ait antijenlerine tolerans gelişirken, yabancı antijenlere karşı gelişen reaksiyonun aşırıya kaçması engellenmeye çalışılır. Timus bu dengenin sağlanmasında anahtar role sahiptir.

1970'li yılların başında immün yanıtı baskılayan bir grup T hücresi tanımlanmış (78) ve yıllarca "supressor T lenfosit" olarak adlandırılmalarına rağmen, bu hücreleri tanımlayan klonların bulunamamış ancak daha sonra 1995 yılında Sakaguchi ve arkadaşları tarafından, farelerde toleransta rol oynayan, otoimmün hastalıkları baskılayan, IL-2 reseptörünün α parçasını (CD25) yapısal olarak üzerinde taşıyan CD4+ hücreler tanımlanmıştır (79). Bu hücrelerin insandaki eşdeğerleri olan

Treg hücrelerinin izole edilmesinde ve tanımlanmasında kullanılan teknolojiye göre gelişmeler sayesinde, son birkaç yıl içinde çalışmalar oldukça önemli bir ölçüde artmıştır. Bu hücrelerin periferik dolaşımdaki ve lenfoid dokudaki CD4+ hücrelerin % 5-10'unu oluşturduğu, ancak dokularda ve kemik iliğinde nadir olarak bulunduğu gösterilmiştir. Bu hücreler sadece CD4+ ve CD8+ T hücrelerini değil B hücrelerini, makrofajları ve diğer miyelositleri kontrol etme kapasitesine sahip regülatuar hücrelerdir. CD4+CD25+ Treg hücrelerinin organizmanın hem kendi hem de yabancı antijenlere karşı immünolojik toleransını, agresif T hücre yanıtını baskılayarak sağlamada, immün sistem homeostazında, patojen ve çevresel faktörlere karşı inflamasyonu kontrol etmede önemli rolü olduğu bilinmektedir (80). Regülatuar T hücreler özellikle inflamasyon bölgesindeki immün yanıtı üç temel mekanizma ile kontrol eder:

- 1) Direkt hücre teması ile sitotoksik hücreleri öldürülmesi,
- 2) Sitotoksik hücrelerin, özellikle IL-2 ve TNF- α gibi sitokinleri üretimini engellenmesi,
- 3) TGF- β ve IL-10 gibi immünmodulasyonda önemli rolü olan sitokinleri bizzat salgılanmasıdır (7).

Bu çalışmaların ışığında Treg hücrelerinin tanımlanan alt grupları arasında; merkezi olarak timusta gelişen, vücudun kendi antijenlerine özel T hücreleri (CD4+CD25^{high}+FOXP3+ Treg hücreleri-Doğal Treg) ile periferde eksojen antijenlere maruz kalmakla gelişen T hücreleri (Adaptif Treg) yer alır (7). Hem doğal hem de adaptif Treg hücrelerinin antijenlere karşı gelişen immün yanıt da ve alerjik hastalıkların önlenmesinde önemli rol oynadıkları düşünülmektedir.

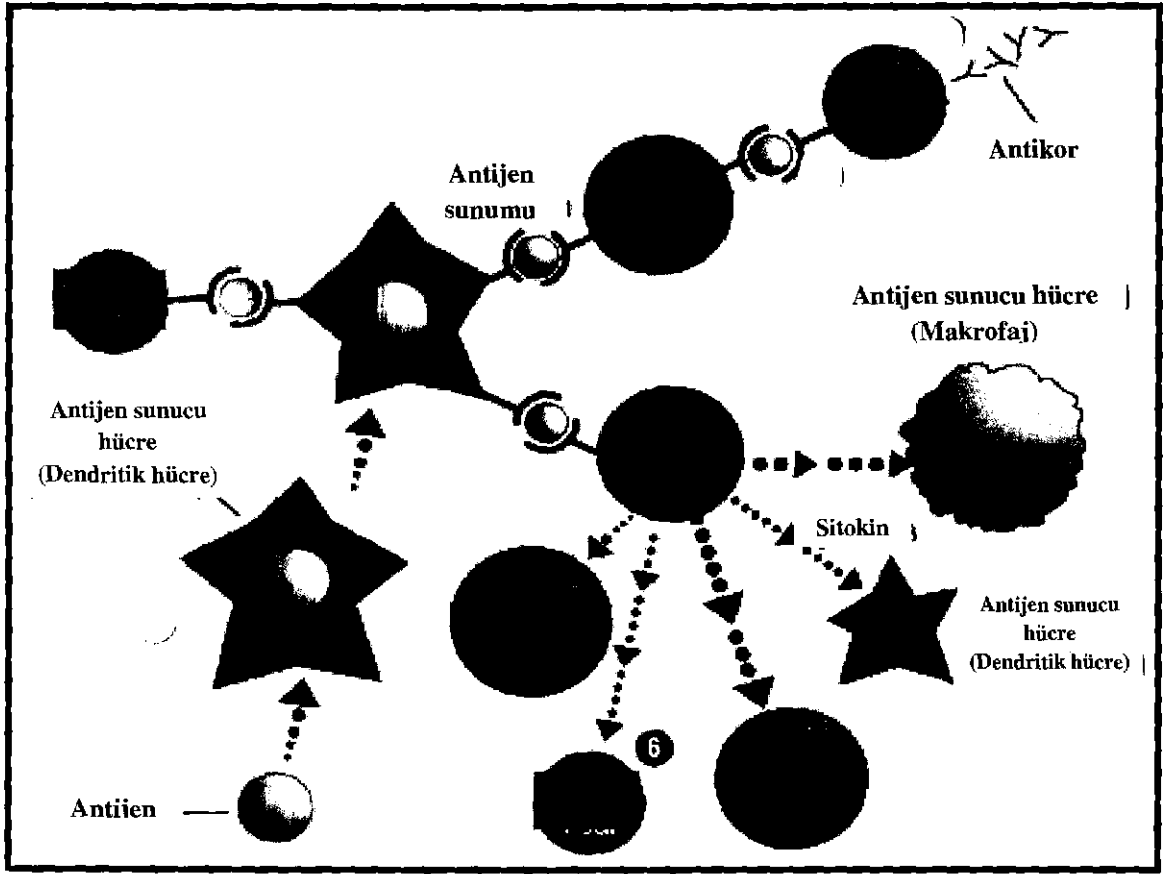
Doğal Treg hücreler (nTreg): Doğal Treg hücreleri timusta gelişir ve periferdeki CD4+ T hücrelerinin % 2-10'unu oluştururlar (81). Yapısal olarak CD25, sitotoksik T lenfosit antijen 4 (CTLA-4), glukokortikoidle indüklenen tümör nekrozis faktör reseptörü (glucocorticoid induced TNF receptor, GITR) ve bir transkripsiyon faktörü olan "forkhead/winged helix transkripsiyon faktörü 3" (FOXP3) eksprese ederler (7,82).

Geçmişte nTreg hücreleri tanımlayan bir belirteç olarak kullanılan CD25 molekül ekspresyonu, adaptif Treg hücreleri tarafından da eksprese edildiği için günümüzde nTreg'lerin tanımlanması için değerini yitirmiştir. FOXP3 ise büyük

oranda CD25'ten bağımsız eksprese olur, etki gösterir ve (82) doğal Treg hücrelerin gelişim ve fonksiyonlarındaki en önemli moleküldür. FOXP3'ün yokluğu CD4+CD25+ Treg hücrelerinin yokluğuna neden olmaktadır (83,84). FOXP3 non-Treg hücrelerde (Th1, Th2, Natural killer hücreler) saptanmaz ancak FOXP3 taşımayan hücrelere transfer edildiğinde, transfer edilen hücreler, nTreg hücrelerinin tüm fonksiyonlarını gösterir hale gelmekte ve aynı yüzey moleküllerini eksprese edebilmektedir. Doğal Treg hücreleri, T hücre reseptörü ile uyarılmalarıyla birlikte bu uyarıma IL-2 eklendiğinde proliferer olur ve hem CD4+ hem de CD8+ hücreleri suprese ederler (85). Aktive olmamış Treg hücrelerindeki FOXP3 mRNA düzeyi, aktive olmuş veya aktive olmamış konvansiyonel CD4+ T hücrelerden 100 kat fazladır (83). Regulator T hücre fonksiyonları için IL-10, IL-2, TGF- β gibi çeşitli faktörler gereklidir. Bunlardan IL-10, intestinal immün denge için en önemli olanıdır. Dalaktan ya da mezenterik lenf nodlarından elde edilen Treg'lerden salgılanan IL-10 düzeyi, kalın bağırsağın lamina propriasından elde edilenlerinkine göre oldukça düşük düzeydedir (86,87).

Glukokortikoidlerle indüklenen Tumor Nekrozis Faktör (TNF) reseptörü (GITR), timus ve periferde, sadece aktive olmayan nTregler üzerinde eksprese olur ve nTreg hücrelerini, THR ile indüklenen apoptozisten korur. Bu mekanizma sayesinde nTreg hücreleri, timus içinde negatif seleksiyondan kurtulmuş olur. GITR periferde ise; agonist ligandı veya özgün antikorları ile birleşince nTreg'lerin meydana getirdiği supresyonu bloke eder. İmmün reaksiyonun erken evrelerinde CD25- hücreler için önemli bir sinyal aracı olan GITR ligandının, enflamasyonun geç evrelerinde oluşan enflamatuvar sinyallerle down regüle olması sonucu supressor T aktivitesi artar ve böylece oluşan enflamasyonun vücuda zarar verecek düzeye gelmeden kontrol altına alınması sağlanır (88).

Treg hücrelerinin olası supresyon mekanizmalarından biri sitolitik aktivitedir. CD4+CD25+FOXP3+ hücreler anti CD3 ve anti CD46 antikorları ile uyarılınca granzim eksprese ederek, perforin aracılı bir mekanizma ile CD4+ ve CD8+ hücreleri öldürebilmektedir (89). Benzer şekilde, lipopolisakkarid ile aktive edilen nTreg hücreler, B hücrelere THR aracılığı ile bağlanarak litik granülleri ile bu hücreleri sitolize uğratabilmektedir. Ancak bu etki perforinden bağımsız olarak meydana gelmektedir (90).



Şekil 2.9: T lenfosit çeşitleri ve etkileşim mekanizmaları.

Adaptif Treg hücreleri: Alerjene özgü adaptif Treg hücreler eksojen allerjenlerle (örneğin yiyecek, bitkilerden) karşılaşıldıktan sonra ve timustan daha çok periferde oluşur. Bu durum, adaptif Treg hücrelerinin doğal Treg hücrelerinden farklı yollarla oluştuğunu göstermektedir.

Adaptif Treg hücrelerinin kolayca tanınmalarını ve izole edilmelerini sağlayacak net işaretleyicileri olmadığından bu hücrelerin oluşumundaki özel karakteristiklerin ve yolların çalışılması oldukça zor olmaya devam etmektedir (7,86).

2.3.3.2. B-lenfositler

Hücre yüzeyinde immunglobulin molekülleri taşıyan ve dolaşımdaki lenfositlerin %5-15'ini oluşturan lenfositler B lenfosit adını alırlar. Miadında doğan

bebeklerde bütün immunglobulinleri yapabilecek B hücreleri bulunmasına rağmen, polisakkarit yapıdaki antijenlere, proteinlere verdiği yanıtı veremez (73,74).

Yabancı antijenlere karşı immün yanıt primer ve sekonder olarak ikiye ayrılabilir. Primer yanıtta antikor titrelerinde hızlı bir artış sonrası plato dönemi ve sonrasında katabolizma görülür, Ig M içeriği yüksektir. Sekonder yanıtta ise antikor titresini çok daha yüksek, daha hızlı ve ağırlıklı olarak Ig G'lerden oluşmaktadır. Birçok antijen için antikor yanıtı oluşabilmesi için koordineli çalışan T lenfosit, B lenfosit ve antijen sunan hücrelerin bulunması gerekmektedir (74,76).

Fetus çok küçük gestasyon haftalarından itibaren serum Ig'lerini üretebilmeye başlar. Ancak fetusun bazı tip antijenlere karşı yanıt oluşturmaması, T hücrelerinin supresyonu, in utero steril ortam gibi nedenlerden dolayı fetus çok az antikor üretir. Doğumda bebeğin dolaşımında ağırlıklı olarak Ig G bulunur ve bunlar bebeğe anneden plasenta aracılığı ile geçen antikorlardır. Ancak zaman içerisinde Ig G düzeyi maternal antikorların katabolizması ile en düşük düzeyler 3-4 aylıkken görülür (73,74,76).

2.4. Laktoferrin

Laktoferrin (LF) ilk olarak 1939'da Sorensen ve Sorensen tarafından keşfedilmiş (96), 1960 yılında ise Groves tarafından sığır ve insan sütünün majör bileşenlerinden biri olarak ayrıştırılabilmektedir (97). 1966 ve daha sonra 1995'te bu proteinin özellikle glandular hücrelerde eksprese olduğu ve mukoza sekresyonlarında bulunduğu gösterilmiştir. Sonraki yıllarda çeşitli araştırmacılar bu proteinin özellikle inflamasyon sırasında, hormonal ya da çevresel uyaranlarla temas sonrasında sekresyonlarda daha yoğun bulunduğunu göstermişlerdir (98).

2.4.1. Genel özellikleri

Laktoferrin, "hem" dışı demir bağlayan ve serumda demirin transportunu sağlayan bir proteindir ve serum transferin, ovotransferrin, melanotransferrin ve karbonik anhidraz inhibitörü gibi transferin protein ailesinin bir üyesidir. Laktoferrin, memelilerin mukozal hücreleri tarafından üretilmektedir (99). Plazma, amnion sıvısı,

gözyaşı, tükürük, semen, safra, idrar, vajinal, nazal, bronşial, gastrointestinal sekresyonlarda mevcut olan bu glikoprotein; en yüksek konsantrasyonda süt ve kolostrumda (7g/l) bulunur. Konsantrasyonu ile kazeinden sonra sütteki en belirgin proteindir (99,100). Nötrofillerdeki ikincil granüllerin içinde de belirgin miktarlarda ($15\mu\text{g}/10^6$ nötrofil) bulunur (101). İnflamasyon sırasında LF düzeyleri biyolojik sıvılarda, özellikle plazmada artış gösterir. Normalde 0,4-2 mg/L olan düzeyi septisemi esnasında 200 mg/L'ye kadar yükselebilir (102).

2.4.2. Moleküler Yapısı

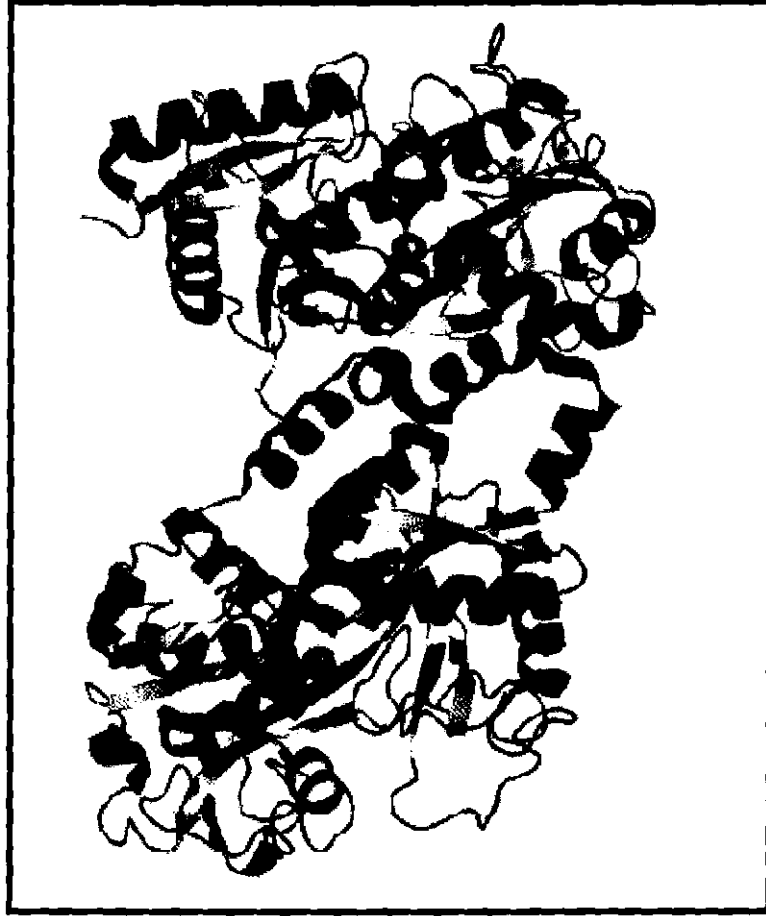
Laktoferrin 80 kDa'luk, 700 aminoasitten oluşan ve türler arasında büyük benzerlik gösteren glikolize bir proteindir. Basit bir polipeptid zincir olan bu glikoprotein ortadan katlanarak birbirine % 33- % 41 oranında benzeyen simetrik C ve N loblarını oluşturur (Şekil 2.10). İnsan LF molekülünde bu iki lob 333 ve 343. aminoasitler arasındaki α -sarmal yapıdaki giriş bölgesi ile birbirine bağlanır ki bu da yapıya ekstra bir esneklik katmaktadır. Polipeptid zincir N-lobunda 1-332, C-lobunda ise 343-703 aminoasitlerini içerir ve her iki lobda ikişer bölge içerecek şekilde α sarmal ve β kıvrımlı yapıdan oluşur. Her iki lob karbonat iyonu (CO_3^{-2}) ile sinerji halinde bir metal atomu bağlayabilir. Bağlayabildiği metaller arasında Fe^{+2} , Fe^{+3} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} bulunmaktadır (99).

Geri dönüşümlü şekilde Fe^{+3} ile bağlanabilir olması nedeniyle apo-LF (Fe^{+3} bağlı değilken) ve holo-LF (Fe^{+3} bağlı) formlarının 3 boyutlu yapıları arasında fark bulunmaktadır. Apo-LF açık bir yapıya sahip iken, holo-LF kapalı bir moleküldür ve proteolize karşı çok daha dirençlidir. Her iki lobda demir bağlayan bölgelerdeki aminoasitler asparjin, tirozin ve histidin iken, CO_3^{-2} iyonu ile bağlanan aminoasit arjinindir. Temel olarak LF pozitif yüklü bir proteindir ve izoelektrik noktası 8,0-8,5 arasındadır (99).

2.4.3. Laktoferrinin biyolojik fonksiyonları

Laktoferrinin çok çeşitli fonksiyonları vardır. Konağın koruyucu sisteminde 1. basamak korumada anahtar bileşendir ve çeşitli fizyolojik, çevresel değişiklikleri

yanıtlama yeteneğine sahiptir (100). Laktoferrinin yapısal özellikleri, tüm transferrinlere özgü Fe^{+3} dengesini sağlamak dışında bakterilere, virüslere, mantarlara, parazitlere karşı güçlü antimikrobiyal aktivitesine, anti-inflamatuar, antikarsinojenik etkilerine ve çeşitli enzimatik fonksiyonlarına yardım etmektedir. İmmünmodulatuar ve myelopoez regülasyonunda da önemlidir (99,100,103).



Şekil 2.10: Laktoferrin molekülü.

Laktoferrinin hücrel demir düzeyleri için anahtar rol oynadığı özellikle sütte yapılan çok çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Yıllar önce anne sütü alan bebeklerde mama alanlara göre çok daha az demir eksikliği geliştiği gösterilmiş (104) ve bu etkide LF'nin de rol aldığı çeşitli organizmalardaki enterositlerde LF reseptörlerinin keşfedilmesi ile desteklenmiştir (105).

2.4.3.1. Antimikrobiyal özellikler

2.4.3.1.1. Antibakteriyel aktivite

Önceki yıllarda, bakterilerin çoğalması için gerekli olan demiri ortamdan toplama özelliği ile sadece apo-laktoferrinin antibakteriyel etkisi olduğu ve bu işlevin ortamdaki demir saturasyonuna bağlı olduğu fikri desteklenmiştir (106). Ancak daha sonra LF'nin *Streptococcus mutans*'ı demirden bağımsız bir mekanizma ile öldürebildiği gösterilmiş ve bunun bakterinin hücre yüzeyi ile etkileşimi sonucu olduğu öne sürülmüştür (107).

Bakteriyel çoğalma için demirin önemi ve konakçının demir bağlama yeteneğine sahip LF gibi moleküllerin varlığı, bazı bakteri türlerinin değişik stratejiler geliştirmesine neden olmuştur. Demir yetersizliği durumunda bir kısım Gram (-) bakteriler demiri, demire doymuş laktoferrinden almak için mekanizmalar geliştirmiştir. Bu mekanizma LF'nin bakteri yüzeyindeki belirli heterodimerik LF reseptörlerine (LbpA ve LbpB) bağlanması ile olmaktadır. Laktoferrin bu reseptörlere bağlandığında C-lobunda şekilsel değişiklik oluşarak içerdiği demiri bakteriyel periplazmik kompartmana bırakır, buradan da demir hücre içine taşınır (108). *Streptokokus pneumonia*'nın özellikle insan LF'nini tanıyabildiği, bağlayabildiği ve bu sayede mukozal yüzeylerdeki demir eksikliğini giderebildiği gösterilmiştir. Streptokok'un LF'i bağlamak için kullandığı reseptörün protein A ile aynı olduğu, buna bağlanarak LF'nin antibakteriyel özelliğinin de azaldığı belirtilmektedir (106).

Biyofilm oluşturmak bakterilerin koloni organizasyonunu gösterir ve antibiyotik ve konakçı savunmasına karşı direncin nedeni olarak kabul edilir. Bu konu özellikle kistik fibrozlu hastalarda *Pseudomonas Aeruginosa* enfeksiyonlarında çalışılmıştır. Laktoferrinin düşük konsantrasyonlarda (20µg/ml) bile biyofilm oluşumunu engellediği gösterilmiştir. LF'nin fizyolojik konsantrasyonlarda *Burkholderia cepacia*'nın da biyofilm oluşturmalarını engellediği, rifampisin duyarlılığını arttırdığı gösterilmiştir (109). *S.Epidermidis*'in biyofilmi LF ile lizozim ve vankomisine daha hassas hale gelmektedir (110). Laktoferrinin biyofilm oluşumunu önlemedeki etkinliği, bakterilerin biyofilm oluştururken ihtiyaç

duydıkları ortamdaki yüksek konsantrasyondaki demiri bağlaması ile ilişkilendirilmiştir. Bunu kanıtlamak için ortama demir ve demire doymuş laktoferrin eklenerek yapılan bir çalışmada *B.cepacia* ve *P.aeruginosa*'nın biyofilm oluşumunun arttığı gösterilmiştir (106).

Laktoferrinin N-lobunun serin-proteaz benzeri aktiviteye sahip olduğu, özellikle arjininden zengin bölgelerden proteinleri yıkabildiği iddia edilmektedir. Çalışmalarda LF'in *H. İnfluenza*'nın IgA1 ve Hap proteinlerini yıkabildiği, böylece *H. İnfluenza*'nın virülansını azaltıp, kolonizasyonu engellediği gösterilmiştir (106).

Çeşitli bakteri türlerinin hedef hücreyi fark ettiklerinde virülansı yüksek proteinlerinin sentezini arttırdıkları bilinmektedir. Laktoferrinin bu tip proteinleri yıkabilme özellikleri *Shigella*'nın bakteriyal invazyondan sorumlu IpaB ve IpaC proteinleri için gösterilmiştir. Benzer etki Enteropatojenik *E.coli*'nin çeşitli tip III sekresyon proteinleri (EspA, EspB, EspC) için de geçerlidir. Bu proteinlerin yıkılması bakteriyal virülansı, adhezyonu engellemektedir. *Salmonella typhimurium*'un HeLa hücrelerine adhezyonu ve invazyonu da LF ile engellenebilmektedir (106,111).

Laktoferrin yüzeyinde geniş katyonik yapılar içeren bir proteindir; bu özelliği gram (-) bakterilerin lipopolisakkarid yapısının bir parçası olan ve anyonik özellik taşıyan Lipid A ile direkt etkileşimine sebep olmaktadır. Bu etkileşim, dış membran geçirgenliğini değiştirerek ve LPS'nin salınımı ile bakteri zarına hasar verir. Laktoferrin bakteri zarını hasarlayarak rifampisin gibi ilaçların antibakteriyel etkisini artırır (112). Laktoferrinin LPS ile etkileşimi aynı zamanda mukozadan salgılanan lizozim gibi doğal antibakteriyellerin etkisini artırır (99).

Laktoferrinin Gram (+) bakterilere karşı etkisi bakteri yüzeyindeki lipoteikoik asit gibi anyon yapılar güçlü net pozitif yüklü yapısı ile bağlanması sonucu oluşur. Organizmanın yüzeyindeki negatif yükün azalması ile lizozimlerin tutunmasını ve duvardaki bir alt tabaka olan peptidoglikan tabakayı enzimatik olarak yıkmasını kolaylaştırmaktadır (99).

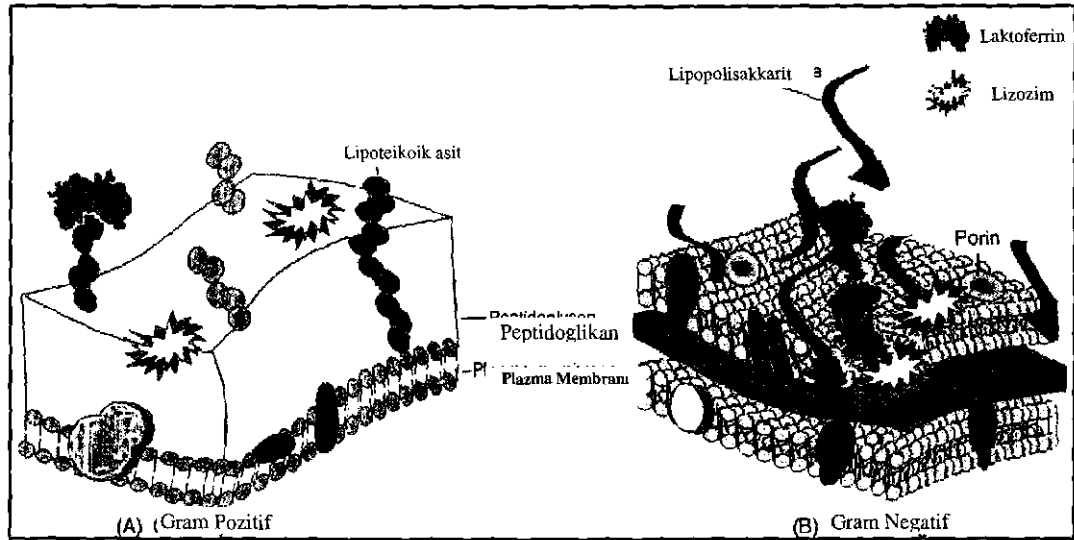
Laktoferrinin Gram (+) ve (-) bakteriler üzerine olan antibakteriyel etkisi Tablo 2.10'da ve Şekil 2.11'de özetlenmiştir.

İn vitro ve in vivo yapılan çalışmalarda LF'nin bazı bakterilerin konakçı hücrelerine yapışmasını engellediği gösterilmekle birlikte bu mekanizmalar net

olarak açıklanamamıştır. Ancak LF'nin yapısında bulunan oligomannosid glikanların bakteriyel adhesinlere bağlanarak bu yapıların konakçı reseptörlerine bağlanmasını engelledikleri düşünülmektedir (99).

Tablo 2.10: Laktoferrinin antibakteriyel etkisi olan bakteriler.

Gram pozitif	Staphylococcus aureus Streptococcus mutans Bacillus stearothermophilus, Bacillus subtilis Clostridium sp. Haemophilus influenzae Micrococcus sp.
Gram negatif	Listeria monocytogenes Chlamydophila psittaci Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) Enteraggregative E. coli (EAEC) Diffusely adherent E. coli (DAEC) Helicobacter felis, Helicobacter pylori Legionella pneumophila Pseudomonas aeruginosa Shigella spp. Vibrio cholerae



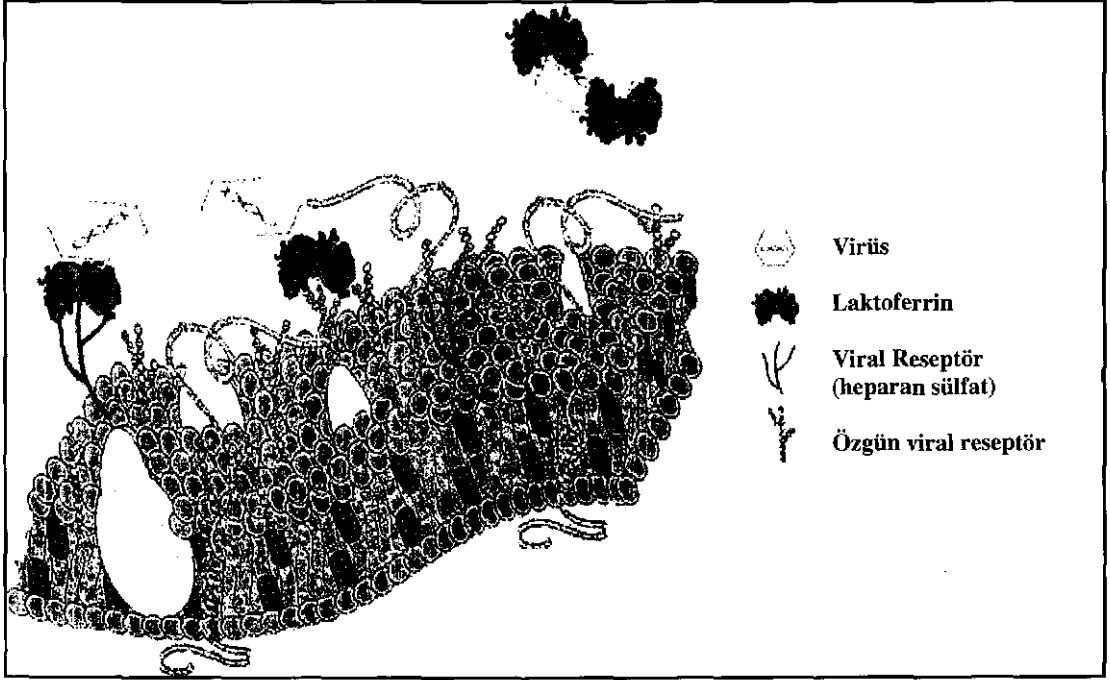
Şekil 2.11: Laktoferrinin antibakteriyel etki mekanizmalarının şematik anlatımı. (A): Laktoferrinin, gram (+) bakteride negatif yüklü lipoteikoik aside bağlanarak duvarın elektrik yükünü nötr hale getirir, lizozim gibi antibakteriyel bileşenlerin etkimesini sağlar. (B): Laktoferrin, gram (-) bakterinin lipopolisakkarid yapısında yer alan lipid A'ya bağlanarak parçalar, hücre zarı hasarlanır.

2.4.3.1.2. Antiviral aktivite

Laktoferrin insanları ve hayvanları enfekte eden çeşitli RNA ve DNA virüslerine karşı antiviral aktivite göstermektedir ancak mekanizmaları henüz netlik kazanmamıştır. Poliovirüs, HSV 1, 2 ve CMV'nin hücre içine girişini, HCV, rotavirüs gibi virüslerin ise viral replikasyonunu engellemektedir. En sık kabul gören mekanizma; LF'nin viral glikozaminoglikan reseptörlerinden özellikle Heparan sülfata bağlanarak bloke ettiği, bu nedenle de virüsün konakçı hücreye yapışamaması ve enfeksiyonu engellemesi şeklindedir (Şekil 2.12) (99).

Yapılan ilk çalışmalarda LF'in sadece zarflı virüslere (HBV, HSV, CMV, HGV, HIV) karşı etkin olduğu ve bunun virüs konakçı etkileşimini ya da virüs parçaları ile konakçı etkileşimin engellemek yolu ile olduğu düşünülmüştü. Ancak son dönemde yapılan çalışmalarda zarfsız virüslerin de (rota, polio, adeno, entero vb.) LF ile inhibe edilebildiği gösterilmiştir. Yapılan tüm çalışmalarda, LF'nin antiviral etkisini enfeksiyonun erken aşamalarında gösterdiği bulunmuştur. In vitro çalışmalarda LF'nin HIV enfeksiyonunda Zidovudin ile, HSV-1 ve HSV-2 enfeksiyonlarında asiklovir ile sinerjistik etki gösterdiği gözlenmiştir. Az sayıda HCV'li hastada yapılan klinik çalışmalarda ise LF'nin interferon ve ribavirin kombinasyon tedavisinin başarısını arttırdığı gösterilmiştir. Oral LF tedavisi, HIV'li çocukların immün yanıtlarında iyileşmeye sebep olmuştur (106).

Laktoferrinin antiviral etkisini açıklamak amacı ile yapılan çalışmalarda, LF'nin in vitro olarak virüsle inkübasyondan 5-10 dakika kadar önce ortama konmasının, virüs inkübasyonundan sonra ortamdan uzaklaştırılsa bile CMV enfeksiyonundan koruduğu gösterilmiştir. Hem insan hem de sığır LF'ninin CMV'nin erken ve geç antijenlerinin ekspresyonunu engellediği ve bunun ortamda Fe^{+3} bulunmasından bağımsız olarak gerçekleştiği gösterilmiştir. Ancak LF'nin bu CMV enfeksiyonunu engelleyici etkileri ortama virüsten sonra eklenmesi durumunda bulunmamaktadır; bu da LF'nin virüsün konakçı hücreye yapışma ve penetre etme evresinde engelleyici rolü olduğunu düşündürmektedir (113). Buna ek olarak HSV-1 ve HSV-2 ile yapılan LF çalışmalarında ortama virüsten önce LF eklemenin sonuçlarda değişiklik yaratmaması, LF'nin antiviral etkisini virüsler üzerinden değil konakçı hücresi üzerinden yaptığını düşündürmektedir (106).



Şekil 2.12: Laktoferrinin antiviral etki mekanizması. LF virüse ve özgün virüs reseptörleri olan glikozaminoglikanlara, heparan sülfata bağlanarak virüsün konakçı hücreye girmesini engeller.

Heparan sülfat ve diğer glikozaminoglikanların HSV'nin hücreden hücreye yayılımında kilit rol oynadıkları bilinmektedir. Virüslerin en çok bağlandığı glikozaminoglikan molekülü heparan sülfattır. Laktoferrin de iki N-lobu ile heparan sülfata güçlü bir şekilde bağlanır ve HSV-1'in bağlanıp hücre içine girişini engeller. Bu nedenle in vitro olarak yapılan çalışmada HSV-1'in LF varlığında yandaki hücreye geçmesi engellenmiş, sığır LF'ninin insan LF'ninden daha etkili olduğu gösterilmiştir (106,114).

Laktoferrinin zarfsız virüsler üzerindeki etkisi doz bağımlı şekilde replikasyonu engellemek şeklindedir. Apo-LF (demir içermeyen LF), rotavirüse bağlanır, hemaglutinasyonu ve virüsün hücreye bağlanmasını engeller. Bu antiviral aktivite Fe^{+3} , Fe^{+2} ile ya da divalent katyon olan Zn^{+2} , Mg^{+2} ile engellenebilir. Poliovirüs ve adenovirüse karşı olan etkisi için viral yapışma basamağından önce ortamda LF bulunması gerekmektedir (106).

Laktoferrinin anne sütündeki 1/10'nden bile az konsantrasyonda respiratuar sinsiyel virüsü (RSV) inhibe ettiği, adenovirus, enterovirus gibi zarfsız

virüslere karşı da etkili olduğu gösterilmiştir. HIV'e karşı etkisi ise konakçı hücrede viral replikasyonun engellemesi ile olmaktadır (99).

2.4.3.1.3. Antifungal Aktivite

Sağlıklı bireylerin mukozal yüzeylerinde kolonize olabilen *Kandida* kommensal bir organizma olarak yaşamakta iken konakçının durumuna göre fırsatçı bir patojen haline gelebilmektedir. Kandidanın çoğalması bazı özgül olmayan, mukozadan salınan IgA, lizozim, histatin gibi konakçı faktörleri tarafından kontrol altında tutulur. *Kandida* türlerinin LF'ne hassasiyeti azalan sıra ile şu şekildedir: *C. Tropicalis*, *C. Krusei*, *C. Albicans*, *C. Guilliermondii*, *C. Parapsilosis*, *C. Glabrata* (115).

Laktoferrinin antifungal etkisi elektron mikroskobu ile gösterildiği kadarı ile hücre duvarında hava kabarcıkları ve şişme ile hücrenin parçalanması şeklinde olmaktadır (115).

Laktoferrin *Candida albicans* ve *Candida krusei*'yi, bakterileri yok ettiği gibi hücre yüzeyinin geçirgenliğini değiştirerek gerçekleştirir (99).

2.4.3.1.4. Antiparazitik Aktivite

Laktoferrinin antiparazitik aktivitesini gösteren çalışmalar çoğunlukla *in vitro* olarak yapılmıştır. İnsan, sığır LF'i ya da sadece N-lobu giardia trofozoitlerinde yapısal değişikliklere sebep olur. Hem Apo, hem de holo-LF *E. Histolytica*'ya zardaki lipidlere bağlanarak hasar verir. Laktoferrin Toksoplazma gondii'nin konakçıya girmesine engel olamaz ancak hücre içinde çoğalmasına engel olur (99,106).

2.4.3.2. İmmünmodulator Aktivite

Laktoferrin doğal ve edinilmiş immün sistemin modulatorlerinden biridir. Bunun kanıtı, insan LF geni ile oluşturulan transgenik farenin benzerlerine göre bakteri yıkımında daha başarılı olması ve oral verilen LF'nin fare ve domuzda

ölümcül bakteriyemide konakçı koruyucu etkilerinin gösterilmiş olmasıdır (116,117). Wakabayashi ve ark, 2006 yılında, “reverse transcriptase PCR” yöntemini kullanarak, bLF verilen farelerin ince bağırsaklarında 20 tane immün ilişkili genin özgül ve özgül olmayan şekilde ekspresyonlarının değiştiğini göstermiştir (118).

Laktoferrinin pozitif yüklü bir molekül olması immün sistemin çok çeşitli hücrelerinin negatif yüklü hücre yüzeylerine yapışmasını kolaylaştırmaktadır. Hücre yüzeyine bu bağlanma hücresel sinyal mekanizmalarını tetikleyerek aktivasyona, değişime ve proliferasyona neden olabilmektedir. Aynı zamanda LF'nin çekirdeğe transport edilip DNA'ya bağlanarak çeşitli sinyal yollarını aktive ettiği gösterilmiştir (99).

Genel olarak fagositler, özellikle de PMN'ler LF'nin hedef hücreleridir. PMN'lerin üzerinde LF bulunur ve mikroorganizmaları bağlamada yer alır. PMN'lerden TNF- α uyarısı sonucu bol miktarda salgınır ve PMN'lerin zarına tutunur. In vitro olarak bu LF salgınımı ve zara tutunmasının, PMN, monosit-makrofajların aktivasyonunu ve fagositozunu arttırdığı gösterilmiştir. LF'nin bu hücrelerin motilitesini, superoksid sentezini, nitrikoksid, TNF- α , IL-8 salgınımını ve fagositozu arttırdığı da gösterilmiştir (116,119). LF'nin özellikle PMN'ler üzerindeki etkisinin kompleman sisteminin (C3) aktivasyonu üzerinden mi olduğu konusu tartışmalıdır. Edinsel immün sistem elemanları da LF'nin hedef hücrelerindendir (116).

Sistemik immüniteyi uyarmanın yanı sıra, LF cilt bağışıklığını uyarabilir ve alerjik reaksiyonları engelleyebilir. Allerjenlere karşı doz bağımlı şekilde langerhans migrasyonunu ve lenf nodlarında dendritik hücre birikimini engellemektedir (99).

2.4.3.3. Anti-inflamatuvar Aktivite

Laktoferrinin anti-inflamatuvar özellikleri ile çok çeşitli kanıt bulunmaktadır. İlk olarak inflamatuvar barsak hastalığı, nörodejeneratif hastalıklar, artrit gibi çeşitli inflamatuvar hastalıklarda bölgesel olarak yüksek konsantrasyonlarda bulunması, çeşitli hayvan çalışmalarında inflamasyon modellerinde koruyucu etkisinin gösterilmesi araştırmacıları hipotez çalışmalarına yönlendirmiştir. 90'lı yıllarda yapılan çalışmalarda özellikle inflamatuvar yanıtın en önemli iki sitokini olan TNF- α ve IL-1 β 'yı ve diğerlerinin aktivitesini engellediği öne sürülmüştür. Daha sonradan

bu aktivitesinin özellikle CD-14 ilişkili pro-inflamatuar yolağı başlatan LPS ve reseptörü olan (CD14, LPS'nin makrofaj-monosit, PMN ve lenfositler üzerindeki majör reseptörüdür) soluble CD14'ü bağlayarak engellemek şeklinde olduğu düşünülmüştür (98). Laktoferrinin CD 14'e bağlanması E-selectin, I-CAM1, V-CAM gibi adhezyon moleküllerini ve IL-8 gibi endotelden salınan kemokinlerin ekspresyonunu engeller. Aynı zamanda LF'nin, bakterilerin immün uyarıcı CpG motiflerine bağlanarak bu yüzey moleküllerinin konakçı B- lenfositlerindeki uyarılmayı engellediği gösterilmiştir. Laktoferrinin monositlere bağlanıp, hücre içine girmesi nükleer faktör (NF)- κ B'nin TNF- α 'ya bağlanmasını engelleyerek, LPS'ye bağlı sitokin üretimini baskılamaktadır (Tablo 2.11) (116).

Sonuç olarak, son yıllarda özellikle üstünde durulan mekanizma; enfeksiyon sırasında özellikle nekroza giden hücrelerden salınan demire bağlı olarak ya da aktif granulositlerden salınma sonucu bol miktarda serbest oksijen radikali oluşmaktadır. Septik şokun patogeneğinde yer alan oksidatif patlama ve pro-inflamatuar sitokinlerin aşırı salınımına karşın LF'nin anti-inflamatuar etkisi sadece ortamdaki fazla demiri bağlayarak değil, LPS ve reseptörleri gibi eksojen proinflamatuar olan bakteri parçacıklarını bağlayarak olabilmektedir (116).

Moleküler düzeyde bakıldığında; LF'in proinflamatuar sitokinler olan IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6'yı inhibe ederek, diğer taraftan ise anti-inflamatuar sitokinler olan IL-4 ve IL-10'u arttırarak anti-inflamatuar etkisini göstermektedir. Hücresel düzeyde ise NK hücrelerini, kandaki PMNL'ları arttırarak, fagositozu uyarak ve miyelopoetik aktiviteyi yöneterek etki oluşturmaktadır.

2.4.3.4. Antikarsinojenik Aktivite

İnflamasyonda olduğu gibi kanserde de LF sitokin üretimini düzenlemektedir. İn vitro olarak LF apoptoza ve tümör büyümesinde duraklamaya neden olmaktadır. Malign hücrelerin hücre döngüsünde G1'den S'ye geçişini ve yapılan bir hayvan çalışmasında rekombinat hLF'nin tümör büyümesini plaseboya göre % 60 oranında engellediği, IL-18 gibi antikarsinojenik sitokin düzeyini arttırdığı, NK ve CD8+ T lenfositlerini aktive ettiği gösterilmiştir. İn vivo çalışmalarda ise oral LF'nin baş

bölgesinde T hücre bağımlı tümörü ve boyun yassı hücre karsinomlarını inhibe ettiği gösterilmiştir (99).

Tablo 2.11: Laktoferrinin immünmodulatuar ve anti-inflamatuar etkileri.

İmmünmodulatuar etki		
Humoral immün sistem		
Sitokin modülasyonu	Sitokin ekspresyonu	Pro-inflamatuar sitokinleri azaltır (IL-1 β , TNF- α , IL-6 ve GM-CSF)
	Hayvanlarda kolitte sitokin ekspresyonu	Anti-inflamatuar sitkinleri artırır (IL-4, IL-10)
Kompleman modülasyonu	Klasik ve alternatif yolak	İmmün modülasyon
Hücrel immün sistem		
T lenfosit maturasyonu	T helper (fare)	Farede oral LF CD 4 hücrelerini artırır, bağırsaktan IgA ve IgG salgılanmasını artırır
NK hücreleri	NK hücreleri (fare)	LF NK hücre sayısını, sitotoksitesini artırır
PMN, monosit-makrofaj	PMN, monosit-makrofaj	Maturasyon, kemotaksi ve fagositozu artırır
Değişik patofizyolojik durumlarda Th1/Th2 cevabı	T lenfosit	Enfeksiyon ve kanser durumunda Th1 cevabını güçlendirerek enfeksiyon ve kanseri kontrol altına almaya çalışır Sistemik Th1 yanıtı oral LF'in intestinal IL-18'i uyarması aracılığı ile olabilir
Anti-inflamatuar etki		
Oksidatif stresi değiştirir	Hepatit C hastalarında sıgır LF	Plazmadaki lipid peroksidasyonunda ve ALT'de azalma
Proinflammatuar molekülleri etkiler	LF gram (-) bakteriye bağlanır, LPS'nin monositlerdeki sCD14 ve mCD14'e, PMN'lerdeki L-selektin'e bağlanmasını engeller	İnflamatuar aktiviteyi ve oksijen radikallerinin salınımını engeller Monositlerde NF- κ B aracılıklı LPS'nin uyardığı sitokin üretimini azaltır.

2.4.4. Laktoferrinden Elde Edilen Biyoaktif Peptidler

Çeşitli çalışmalarda pepsin ile karşılaşan bLF'den düşük moleküler ağırlıklı bir peptid olduğu ve bu peptidin birçok gram (+) ve (-) bakterilere karşı antibakteriyel etki gösterdiği bulunmuştur. Bellamy ve ark, büyük molekülden

ayrıldıktan sonra bile biyolojik aktivitesini koruyan N-ucunu tanımlamıştır. LF'den daha güçlü antimikrobiyal etkilere sahip bu molekül Laktoferrisin B olarak adlandırılmıştır (120). In vitro ve in vivo çalışmalar insan laktoferrisinin iki farklı katyonik bölge içerdiği; bunlardan 1.'sinde dört pozitif yüklü arjinin içerdiği ve bu bölgenin insana özgül olduğu, 2. bölgenin ise türler arası benzerlik gösteren halka yapısı içerdiği gösterilmiştir (98).

2.4.5. Laktoferrinin Prebiyotik Özellikleri

Laktoferrinin pepsinle sindirilmesi sonucu oluşan peptidlerin bifidobakterlerin çoğalması üzerine olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu peptidlerin, tripsin, kimotripsin gibi diğer GİS proteazlarına maruz kalmaları olumlu etkilerini azaltmadığı için, in vivo olarak etkili olabilecekleri öngörülmektedir (121).

2.4.6. Oral Laktoferrinin Emilimi ve Etki Mekanizmaları

Oral LF'nin muhtemelen bir kısmı tam olarak sindirilmemektedir ve fonksiyonel peptidlerden biri olarak alt GİS'te bulunmaktadır. Sindirim sisteminde sindirilmemiş LF ve sindirilmiş ancak biyolojik olarak aktif LF peptidleri çeşitli bakteriyostatik, bakterisidal ve anti-inflamatuvar etkilerini göstermektedirler. Oral yolla verilen LF'nin GIS dışında da faydalı etkilerinin görülmesi, sistemik dolaşıma geçip geçmediğini sorgulamaya yol açar. İntestinal mukozal hasarı olan infant ya da erişkin de bunun mümkün olduğu düşünülmekle birlikte, hayvan deneylerinde çok yüksek konsantrasyonda verilen LF sistemik dolaşımda tespit edilememiştir. Bu nedenle oral LF'nin öncelikle intestinal immün sistem üzerinde etkili olduğu ve sistemik immünite üzerinde ikincil bir etkisi olduğu düşünülmektedir (103).

Oral LF'nin intestinal epitel hücrelerinde IL-18 üretimini, intestinal mukozada da CD4+, CD8+ ve NK hücrelerini arttırdığı gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan bir çalışmada, oral LF'nin intestinal epitel üzerindeki etkilerine ek olarak Peyer plaklarında ve mezenterik lenf nodlarında tip 1 IFN'ları ve sonrasında da NK aktivitesini arttırdığının bulunması, IL-18 gibi humoral faktörlerin ve düzeyleri artan

immün sistem hücrelerinin, intestinal ve sistemik immün sistem arasındaki köprü olabileceğini düşündürmektedir (103).

Oral alınan LF'nin etkilerini gösterebilmesi için öncelikle enterositlere bağlanması gerekmektedir. İlk olarak intestinde bulunmasından ve lektin aktivitesinden dolayı insan LF reseptörleri intellektin ismini almıştır. Önceleri sadece insan LF'ini bağlayabileceği düşünülen intellektinin, 2008 yılında yapılan bir çalışmada ısıya maruz bırakılmamış sığır LF'nini de bağladığı gösterilmiştir (120).

2.4.7. Laktoferrin Gen Regülasyonu

Hem insan hem de hayvana ait farklı dokularda tanımlanan LF'in türler arasında oldukça geniş bir benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Dokuya göre mRNA düzeylerinin değişmesi, doku ya da hücreye özel regülasyonunun olduğunu göstermektedir. İnsanda LF geni 9. Kromozom üzerinde bulunur. Türler arasında genin genişliği 2055 ile 2190 baz rezidüsü arasında değişiklik göstermektedir (99).

3. OLGULAR VE YÖNTEM

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Neonatoloji Bilim Dalı, Yenidoğan Yoğunbakım Ünitesi'nde Aralık 2009 ve Ocak 2011 tarihleri arasında yatarak izlenen, gestasyon yaşı 32 haftanın altında ve/veya doğum ağırlığı 1500 g'ın altında olan prematürelerde prospektif, randomize, plasebo kontrollü yapılmıştır.

3.1. Olguların Seçimi

3.1.1. Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri

Çalışma süresi içerisinde Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda doğan ve Yenidoğan Yoğunbakım Ünitesi'ne yatırılan 32 haftanın altında ve/veya doğum ağırlığı 1500 g'ın altında olan, çalışmadan dışlanma kriterleri taşımayan ve bilgilendirilmiş aile onamı alınan prematüre bebekler çalışmaya dahil edildi. Aile onayı için bilgilendirilmiş gönüllü onam formu kullanıldı (Ek 1).

3.1.2. Çalışmadan Dışlanma Kriterleri

- Yaşamı tehdit eden ağır konjenital malformasyon varlığı,
- Perinatal asfiksi,
- Aile onamının olmaması,
- Postnatal ilk 72 saat içerisinde kaybedilen bebekler çalışma dışında bırakılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Olgu Verilerinin Kaydı

Çalışmaya alınan bebeklerin demografik özellikleri, prenatal özellikleri, doğum bilgileri kaydedildi (Ek 2).

Demografik özellikler olarak; adı-soyadı, dosya numarası, anne yaşı, gestasyon haftası, cinsiyet kaydedildi.

Prenatal özellikler olarak; annenin gebelikte geçirdiği hastalıklar, gestasyonel diyabet, preeklamsi, eklamsi, gebeliğe bağlı hipertansiyon varlığı, gebelikte ilaç kullanımı, erken doğum eylemi, EMR varlığı, antenatal steroid uygulama ve zamanlaması kaydedildi.

Doğum bilgileri olarak; doğum tarihi, doğum ağırlığı, 1. ve 5. Dakika Apgar skorları, doğum şekli kaydedildi.

Çalışmaya dahil edilen her bebek için kapalı zarf yöntemi kullanılarak basit randomizasyon yapıldı. Randomizasyonun yanı sıra, iki grubun birbirleriyle karşılaştırılabilir olması ve anlamlı fark yaratacak perinatal risk faktörleri açısından benzer olduklarını değerlendirebilmek için SNAPPE-II skrolama sistemi (122) kullanıldı.

Çalışmaya dahil edilen tüm bebeklere gereksinimleri ve servis protokolleri doğrultusunda gerekli tüm medikal ve cerrahi girişimler yapıldı.

Beslenme trofik olarak tüm bebeklere ilk 24 saat içinde kolostrum olarak başlandı. Yaşamın ilk 3 gününde <1000 g bebekler için minimal enteral beslenme olarak devam edildi. Beslenme intoleransı olmaması durumunda beslenme miktarlarındaki günlük artış 20 ml/kg olacak şekilde yapıldı. Tüm bebekler kendi annelerinin sütü ile beslendi. Anne sütü, günlük enteral beslenme hacimi 80 ml/kg'ı geçtikten sonra anne sütü güçlendiricisi Eoprotein® (Milupa) 100 ml anne sütüne 3 ölçek (4,2 g) konularak fortifiye edildi. Anne sütünün yetersiz olması durumunda bebekler prematüre bebek maması ile beslendi.

Parenteral beslenme, tüm ÇDDA bebeklere doğumdan hemen sonra stok solüsyonu (28 cc %10 protein solüsyonu + 112 cc %10 Dx) ile başlanmaktadır. Kan şekerini normal aralıklarda tutmak ve yeterli kalori desteğiyle optimal büyümeyi sağlamak için 6-18 g/kg/gün glukoz, 3,5-4,5 g/kg/gün protein ve tolerans değerlendirilerek lipid infüzyonu yapılmaktadır.

Sepsis tedavisinde; servisteki en son üreyen mikroorganizmalar göz önüne alınarak geniş spektrumlu antibiyotik kombinasyonu ampirik olarak başlanmış, klinik sepsis bulguları varlığında hastalara antibiyotikle eş zamanlı olarak IgM'den zenginleştirilmiş immungobulin, 5 ml/kg/gün dozunda üç güne tamamlanacak

şekilde verilmiştir. Sepsise nötropeni (absolü nötrofil sayısı -ANS- < 1250 /mm³) eşlik etmesi durumunda 10 µg/kg/gün dozunda G-CSF uygulanmış, tekrarlayan dozlara günlük ANS sayısına göre karar verilmiştir.

3.2.2. Çalışma Protokolü

Grup 1 (laktoferrin grubu): Beslenme 20 ml/kg/gün hacmine ulaşıldıktan sonra, hastanede yatış süresince günde bir defa 200 mg laktoferrin (LF-100[®], Dicofarm Spa, İtalya) oral beslenmeye katıldı. İki kapsül LF-100[®]'ün içindeki granüller anne sütü ya da mamanın içinde çalkalanarak eritildikten sonra bebeğe verildi.

Grup 2 (plasebo-kontrol grubu): Beslenme 20 ml/kg/gün hacmine ulaşıldıktan sonra, hastanede yatış süresince günde bir defa 2 ml serum fizyolojik (SF) oral beslenmeye katıldı.

Her iki grupta da beslenme intoleransı olması durumunda, intoleransın düzelmesini takiben 20 ml/kg/gün beslenme hacmine ulaşıldıktan sonra yeniden laktoferrin yada SF eklendi. Ara verilen gün sayısı kaydedildi.

Çalışma süresince her iki gruptaki bebeklerin;

- Beslenme miktarları, içeriği (AS/F),
- Tamamen ağızdan beslenmeye geçiş günleri,
- Beslenme intoleransları (gastrik rezidüleri, kusmaları, batın distansiyonları, gayta sayıları),
- Sepsis ve NEK atakları,
- Kan parametreleri,
- Verilen ilaçlar (antibiyotik, immunmodulator tedaviler) kaydedildi.

Hastalarla ilgili tüm veriler Form 1'e (Ek 2) kayıt edildi.

Profilaksinin etkinliğinin değerlendirilmesi için plasebo kontrol grubu ve laktoferrin profilaksi grubunun aşağıdaki özelliklerinin karşılaştırılması planlandı:

- Taburcu olana kadar geçirecekleri nozokomiyal sepsis atakları,
- Nozokomiyal sepsise bağlı mortalite,
- Nekrotizan enterokolit (laboratuvar ve klinik evrelemesi, cerrahi ihtiyacı),
- FOXP3 ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler.

Çalışmanın ikincil sonuçları olarak;

- Laktoferrinin oral toleransının ve yan etkilerinin değerlendirilmesi
- Hastanede yatış süresinin değerlendirilmesi planlandı.

3.2.3. Kan Örneklerinin Çalışılması

T-regulatuvar hücre düzeylerinin bazal değerine doğumdan sonraki ilk 48-72 saatte, bir kez de bebeğin taburculuğu esnasında ölçülmesi planlandı. Bu amaçla alınacak kan örneğinin bebeğe fazladan bir girişim ya da kan kaybına sebep olmaması için; ilk değerlendirmenin, YDYBÜ'nin protokolleri doğrultusunda yatan her bebekten, yatış anında tam kan sayımı ve periferik yayma çalışılmak üzere alınan kan örneğinden, ikinci değerlendirmenin ise taburculuk öncesi alınan tam kan sayımı örneğinden artan kan ile yapılması planlandı.

Alınan kan örnekleri CD4+CD25+FOXP3+ regulatuvar T hücrelerinin belirlenmesi için, İmmünoloji-Allerji Bilim Dalı'na bağlı İmmünoloji Araştırma Laboratuvarı'nda, akım sitometrisinde yüzey ve intrasitoplazmik boyama metodu ile 3 renkli direkt immunofloresan yöntemi uygulanarak ölçüldü. Çalışmada CD 25 FITC (Immunotech, Marseille, France), CD 4 PC5 (Immunotech, Marseille, France), Anti Human FOXP3 PE (eBioscience), Staining Buffer Set (eBioscience) malzemeleri kullanıldı.

Test Protokolü

- 1- EDTA'lı tüpe alınan periferik kan örneğinden 100µl polisteren tüp içine koyuldu.
- 2- CD4-PC5 ve CD25-FITC monoklonal antikoları yüzey boyama protokolüne göre tüp içine eklenip +4°C de 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 3- İnkübasyon sonunda tüp soğuk PBS kullanılarak yıkandı ardından intrasitoplazmik boyama protokolüyle devam edildi.
- 4- Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine taze hazırlanmış "1xFix/Perm working solüsyonu"ndan eklenip +4°C de 45 dakika inkübasyona bırakıldı.

- 5- İnkübasyon sonunda tüp içine 1xPerm Buffer eklenip santrifuj edilerek 2 kez yıkandı.
- 6- Yıkama sonunda pellet üzerine 5 µl FOXP3 PE monoklonal antikoru eklenip +4°C de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 7- İnkübasyon sonunda tüp içine 1xPerm Buffer eklenip santrifuj edilerek 2 kez yıkandı.
- 8- Yıkama sonunda süpernatant uzaklaştırılıp pellet PBS ile “resuspanse” edilerek akım sitometrisinde (Cytomics FC500 Flow Cytometer, Beckman Coulter Corp. Miami, FL, USA) analiz edildi.
- 9- Analizler, 488 nm lazer eksitasyon (argon-ion), yana saçılım (SS), 90° ile saçılım (FS) ve floresan FL1, floresan FL2, floresan FL4 detektörleri kullanılarak; işlemler ise CXP SoftWare version 2.2 programı ile yapıldı.
- 10- SS’e karşı FS detektörlerinin kullanımı ile hücreler büyüklük ve granül içeriklerine göre bilgisayar ortamına yansıtılıp CD4+ lenfositler, yerleşim yerleri esas alınarak ayrıldı. Bu CD4+ lenfosit kapısı içinde yer alan CD4+CD25high+ hücre grubu seçilerek bu populasyondaki FOXP3 ekspresyonu ölçüldü.

Elde edilen veriler hastaya ait demografik özellikleri de içeren Form 2’ye kaydedildi (Ek 3).

3.3. Tanımlar

Doğum Ağırlığı: Hastaların doğum ağırlıkları, doğumdan hemen sonra YDYBÜ’ne getirildiğinde Air Shields Vickers marka dijital tartı ile çıplak olarak tartılmıştır.

Çok düşük doğum ağırlığı: <1500 g

İleri derecede düşük doğum ağırlığı: <1000 g

Gestasyon Haftası: Anne son adet tarihini kesin olarak biliyorsa, Neagle formülü kullanılarak hesaplanmış ve Yeni Ballard skorlaması ile teyit edilmiştir.

Neagle formülü: Son adet tarihi+7 gün-3 ay

Anne son adet tarihini bilmiyorsa ilk trimestr USG sonucu ile ve Yeni Ballard skorlaması yapılarak gestasyon haftası belirlenmiştir.

Antenatal steroid (ANS): 1995 yılından beri, 24-34. gebelik haftasında erken doğum riski olan tüm gebelere 24 saat arayla iki defa 12 mg ya da 12 saat arayla dört defa 6 mg dexametazon şeklinde yapılması önerilir (123,124).

Erken membran rüptürü (EMR): Doğum eylemi başlamadan önce fetal membranların açılmasıdır. Preterm EMR ise, 37. gebelik haftasından önce membranların açılmasıdır. Eğer membran açılmasını takiben 18-24 saat içerisinde doğum gerçekleşmezse, bu durum uzamış membran rüptürü olarak tanımlanmaktadır.

Koryoamniyonit: İntrauterin dönemde koryodesidual bölgenin veya koryoamniotik zarların, amniyotik sıvının ve umbilikal kordun inflamasyonudur. Histolojik koryoamniyonit, normalde steril olan dokuların patojenlerle invazyonu ile birliktedir. Histolojik bulguların yanı sıra mikrobiyolojik ve biyokimyasal belirtiler koryoamniyonit tanısı için gereklidir. Doğumdan önce annede 2 kez 38°C'yi, 1 kez 39°C'yi aşan ateş, akut faz reaktanlarında yükselme, kötü kokulu veya bulanık vajinal akıntı, uterus hassasiyeti, doğum sırasında amniyotik sıvının berraklığını kaybetmiş ve kötü kokulu olması veya plasentanin histopatolojik incelemesinde yada kültüründe enfeksiyon saptanması koryoamniyonit olarak kabul edilmiştir.

SNAPPE-II ("Score for Neonatal Acute Physiology with Perinatal Extensions"): Neonatal sonuçları ölçmek, tahmin edebilmek, hastanın ciddiyetini değerlendirebilmek, klinik araştırmalarda çalışma gruplarını karşılaştırabilmek ve YDYBÜ'lerinin performanslarını değerlendirmek ve karşılaştırabilmek için geliştirilmiş çeşitli skorlama sistemlerinden biridir (Ek 4) (122).

Sepsis: Hipotoni, hipoaktivite, cilt perfüzyonunda bozulma, sarılık, hipotansiyon, vücut ısı regülasyonunda bozulma, beslenme intoleransı, abdominal distansiyon, kusma, apne, bradikardi, siyanoz, solunum sıkıntısı, ventilasyon destek ihtiyacında artış gibi özgün olmayan bulguların görüldüğü bebeklerde fizik muayene tekrarlanarak enfeksiyon odağı arandı ve septik skorlama yapılarak kan, idrar, beyin omurilik sıvısı (BOS) kültürleri alındı. Beyaz küre sayısı (<5000/mm³ veya >25000/mm³), immatür granülosit/total granülosit oranı >0.2, sedimentasyon (>15 mm/saat) ve C-reaktif protein yüksekliğine (>0.8 mg/dl) dayanan Phillip-Hewitt Skorlaması kullanıldı. Bu parametrelerden ikisi pozitif ise "şüpheli sepsis" olarak

kabul edilmiştir. Alınan kültürlerde mikroorganizma üremesi olan olgular “kanıtlanmış sepsis”, üreme olmayan olgular ise “klinik sepsis” olarak kabul edildi.

Beslenme intoleransı: Hastalarda beslenme intoleransı kriterleri dikkate alınarak oral beslenmeye devam edildi.

Beslenme intoleransı;

- 1- Kirli (safra)li gastrik rezidü olması,
- 2- Öğün hacminin yarısından fazla gastrik rezidü bulunması,
- 3- Safra kusma,
- 4- İki öğün arasında herhangi bir zamanda sindirilmemiş beslenme içeriğini kusma olarak kabul edildi.

Hastaların beslenme intoleranslarını değerlendirmek için O/G drenajda geçirdikleri, kusma ($\geq 1/\text{gün}$) ve rezidü (kirli veya öğünün yarısından fazla) görülen günler kaydedildi. Bebeklerin hastanede yatış süreleri farklı olduğu için, beslenme intoleransı görülen günler tüm yatışın yüzde kaçını oluşturduğunu değerlendirmek için de her parametre için indeks değerler hesaplandı.

- O/G drenaj indeksi: $(\text{O/G drenajda geçirilen gün} / \text{toplam yatış gün}) \times 100$
- Rezidü indeksi: $(\text{Rezidü görülen gün sayısı} / \text{toplam yatış gün}) \times 100$
- Kusma indeksi: $(\text{Kusma görülen gün sayısı} / \text{toplam yatış gün}) \times 100$

Nekrotizan enterokolit: Kusma, karında distansiyon, beslenme intoleransı gelişen bebekler NEK açısından değerlendirilmiştir. NEK evrelemesi, Modifiye Bell evrelemesi kullanılarak yapılmıştır (bkz. Tablo 2.8).

Respiratuar Distres Sendromu (RDS): Ünite protokolleri doğrultusunda; 28. haftadan önce doğan tüm bebeklere ve 28-30 haftada doğan bebeklerden antenatal steroid almayan veya eksik doz alanlara, doğum salonunda entübe edilerek profilaktik surfaktan (Curosurf-proctant alfa, Chiesi Farmaceutici, Parma, Italy) 100 mg/kg dozunda uygulanarak sonrasında ekstübe edildi. T-parçalı resesütasyon cihazı (Neopuff Infant Resuscitator, Fisher & Paykel Healthcare, Auckland, New Zealand), ile 4-6 cmH₂O PEEP basıncı ve %21-40 oksijen uygulanarak üniteye transferi nakil küvözü ile gerçekleştirildi. 30. haftadan sonra doğan veya ANS dozu tam olan 28-30 haftadaki prematürelere ise üniteye transfer sonrasında klinik, kan gazı ve radyolojik

bulgulara göre ilk 2 saat içerisinde tanı konularak “kurtarıcı surfaktan” tedavisi uygulanmıştır.

Patent Duktus Arteriozus (PDA): Çalışmaya dahil edilen hastalara postnatal 2. 24 saatte, klinik olarak semptomların (taşikardi, solunum sıkıntısı, diyastolik tansiyon düşüklüğü, nabız basıncında artma, femoral nabızlarda vurucu nabız alınması) bulunması durumunda, Pediatrik Kardiolog tarafından hasta başı ekokardiyografik değerlendirme yapılmıştır. Duktus internal çapının bebeğin doğum ağırlığına oranı (mm/kg) $>1,5$ ve/veya sol atriyum/aorta oranı $>1,5$ olması durumunda duktusun medikal olarak kapatılmasına karar verilmiştir. Medikal tedavide oral veya intravenöz ibuprofen 24 saat aralıklarla 10, 5, 5 mg/kg dozunda uygulanmıştır. Her doz öncesi hasta ekokardiyografik olarak yeniden değerlendirilerek, duktusun kapanması durumunda gereksiz ilaç dozu engellenmiştir.

3.4. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi SPSS for Windows 16.0 paket programında yapılmıştır. Sürekli ölçümlü değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri ortalama $\pm$ standart sapma veya ortanca (minimum-maksimum) biçiminde gösterilmiştir. Sürekli ölçümlü değişkenlerin normal dağılıma uygun olup olmadığı One Sample Kolmogorov-Smirnov testi ile araştırıldı. Gruplar arasındaki ortalamaların farkının önemliliği Student’s t testi ile, ortanca değerlerin farkının önemliliği Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Bağımlı değerlerin farkının önemliliği Paired Samples testi ile hesaplandı.

Nominal değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri olgu sayısı ve % şeklinde ifade edildi. Nominal değişkenlerin gruplar arasındaki farkının önemliliği Pearson’s Ki-Kare veya Fisher’s Kesin Sonuçlu Ki-Kare testi ile değerlendirildi.

Gruplar arasındaki farkın $p<0.05$ olması durumunda karşılaştırılan parametreler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.5.Etik Onay

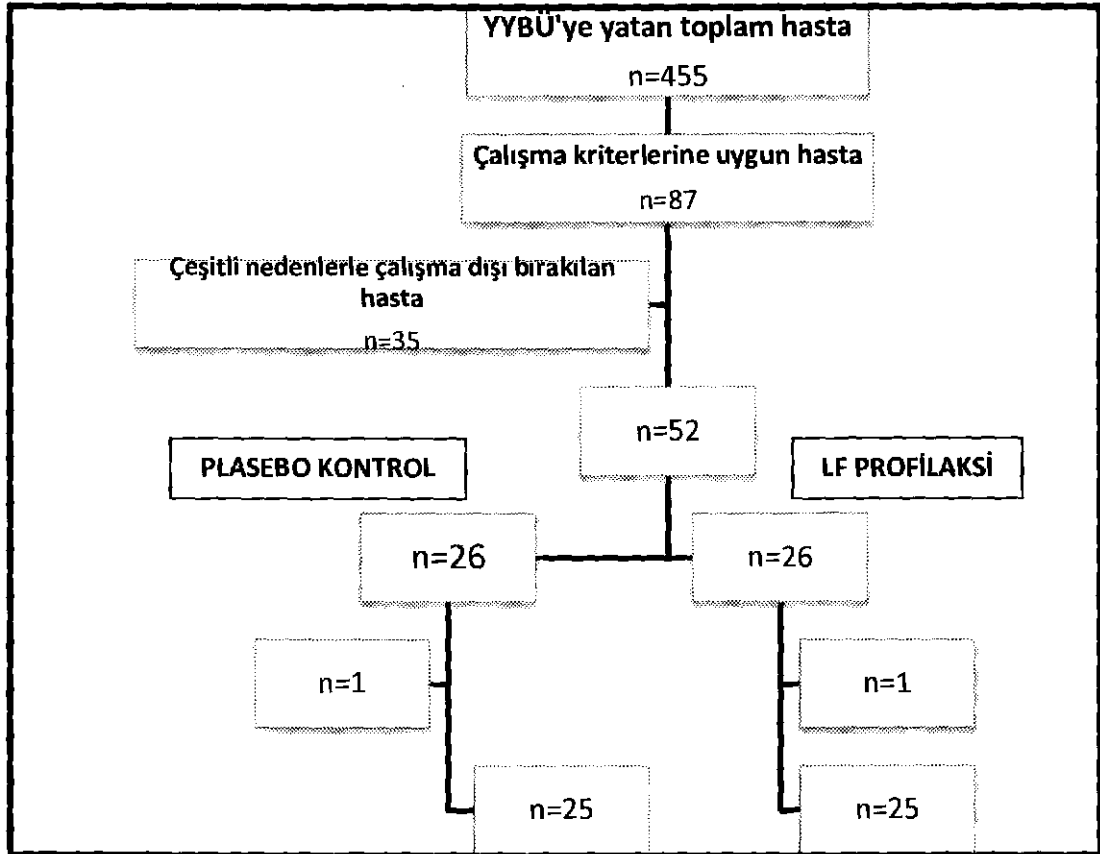
Bu çalışma için Ankara 2 No’lu Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı’na başvurularak, 7 Aralık 2009’da 70 karar numarası ile etik kurul onayı alınmıştır.

3.6. Mali Destek

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Ofisi tarafından 19 Mart 2010 tarihinde onaylanan 10B3330011 proje numarası ile desteklenmiştir.

4. BULGULAR

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Neonatoloji Bilim Dalı, YYBÜ'nde yatan ÇDDA bebeklerde prospektif, randomize, plasebo kontrollü olarak Aralık 2009 ve Ocak 2011 tarihleri arasında yapılmıştır. Çalışma süresi içerisinde YYBÜ'ne yatan toplam 455 hastadan çalışma kriterlerine uygun olan hasta sayısı 87 idi. İlk 72 saat içerisinde kaybedilen 6 hasta, Treg düzeyi için örnek alınamayan 18 hasta ve ailenin onamı olmayan 11 hasta çalışma dışında kalmıştır. Elli iki hastadan 26'şar hasta basit randomizasyon yöntemlerinden zarf yöntemi kullanılarak, plasebo kontrol (Grup 1) veya oral laktoferrin (LF) profilaksi (Grup 2) grubuna dahil edildi. Oral LF profilaksi grubundaki hastalardan bir hasta hiç profilaksi almadan 14. gününde eksitus olduğu için, plasebo grubundaki bir hasta ise beslenme hacmi doğduğu günden itibaren çalışma süresi sonuna kadar 20 ml/kg/gün'e ulaşmadığı (NEK, kandida sepsisi, ileus tabloları nedeniyle) için çalışma dışı bırakıldı. Her iki gruptaki 25 hasta değerlendirildi. Gruplardaki Hasta verileri Tablo 4.1-4.8'de sunuldu.



Şekil 4.1: Çalışma gruplarının oluşturulması.

Tablo 4.1: Plasebo kontrol grubundaki hastaların verileri-1.

	Cinsiyet	GH	DA	ANS	EDE	EMR	Koryo- amnionit	Pre- eklamsi	Kronik hast	Gebelikte ilaç	Doğum şekli	APGAR 1/5	SNAPPE
Bebek Ş (x)1	0	28,2	990	2	1	1	1	0	0	1	1	6/8	19
Bebek Ş 1	0	29,6	1360	2	1	0	0	0	0	0	1	7/8	0
Bebek Ş 2	0	29,6	1480	2	1	0	0	0	0	0	1	6/8	7
Bebek A	0	30,3	1860	2	1	0	0	0	0	0	1	9/10	5
Bebek E 2	1	30,1	1660	1	1	0	0	0	0	0	1	7/9	12
Bebek E 3	0	30,1	1210	1	1	0	0	0	0	0	1	8/9	0
Bebek Y	0	34,1	1270	2	0	0	0	1	0	0	1	8/9	12
Bebek G	0	32	1250	2	0	0	0	1	1	1	1	8/9	12
Bebek Ö	1	34	1300	0	1	1	0	1	0	0	1	8/9	12
Bebek S	0	28	1100	2	0	0	0	0	0	0	1	7/9	0
Bebek K	1	31,2	1130	2	0	0	0	1	0	0	1	7/9	0
Bebek Ka.	0	31,1	1090	2	0	0	0	0	0	1	1	6/8	5
Bebek K1.	1	34,1	1500	2	0	0	0	0	0	1	1	8/9	0
Bebek D	1	34	1420	2	1	1	0	0	1	1	1	6/8	28
Bebek A 2	1	30	1490	0	1	0	0	0	0	0	0	7/9	9
Bebek D 1	0	31,4	1500	2	1	1	0	0	0	1	1	8/9	0
Bebek D 2	0	31,4	1490	2	1	1	0	0	0	1	1	8/9	0
Bebek Ç	0	30	1160	0	0	0	0	1	0	0	1	5/8	16
Bebek K	0	31	1580	0	1	1	1	0	0	0	1	7/9	5
Bebek E	1	30	1045	2	0	0	0	0	0	1	1	7/9	0
Bebek Ü	1	29,1	1250	2	1	0	0	0	0	1	1	8/9	0
Bebek Ey.	1	27,2	1020	2	1	1	0	0	0	0	1	8/9	9
Bebek N	1	24,6	1010	1	1	1	1	0	0	1	1	8/9	5
Bebek Y	1	31,5	1730	2	1	0	0	0	1	1	1	8/9	0
Bebek A 3	0	25,1	780	0	1	1	1	0	0	1	0	6/8	47

Cinsiyet: 0:kız,1:erkek, ANS: 0:hiç yapılmamış, 1:eksik doz, 2:tam doz, EDE: 0:yok,1:var, EMR: 0:yok,1:var, Koryoamnionit: 0:yok, 1:var, Preeklamsi: 0:yok,1:var, Kronik hastalık: 0:yok,1:var, Gebelikte ilaç: 0:yok, 1:var, Doğum şekli: 0:NSVY, 1:CS,

Tablo 4.2: Plasebo kontrol grubundaki hastaların verileri-2.

	RDS	CPAP süresi	MV süresi	UAK	UAK süresi	UAK üreme	UVK	UVK süresi	UVK üreme	Amp-Amino	Antib. süre	Penta	G-CSF
Bebek Ş (x)1	1	12	0	1	5	0	1	8	0	1	3	1	0
Bebek Ş 1	0	0	0	0			0			1	4	1	1
Bebek Ş 2	1	8	0	0			0			1	5	0	1
Bebek A	1	96	0	0			0			1	7	1	0
Bebek E 2	1	48	0	0			0			1	5	0	0
Bebek E 3	0	0	0	0			0			1	6	0	0
Bebek Y	0	0	0	0			0			0		0	0
Bebek G	1	48	0	0			0			0		1	0
Bebek Ö	0	0	0	0			1	12	0	0		0	0
Bebek S	1	12	0	1	6	0	1	10	0	0		1	0
Bebek K	0	0	0	0			0			0		1	0
Bebek Ka.	1	4	0	0			0			0		0	0
Bebek K1.	0	0	0	0			0			0		0	0
Bebek D	1	60	0	0			0			1	6	0	0
Bebek A 2	1	4	0	0			0			1	5	0	0
Bebek D 1	0	0	0	0			0			1	4	1	0
Bebek D 2	0	0	0	0			0			1	4	1	0
Bebek Ç	1	2	0	0			0			0		0	0
Bebek K	1	13	0	0			1	6	S.epidermidis	1	10	1	1
Bebek E	0	0	0	0			0			1	8	0	0
Bebek Ü	1	4	0	0			0			1	8	0	0
Bebek Ey.	1	4	0	0			0			1	7	1	1
Bebek N	1	120	0	0			1	16	MRKNS	1	2	1	1
Bebek Y	0	0	0	0			0			1	7	0	0
Bebek A 3	1	2	336	1	14	0	1	14	0	1	3	1	1

RDS: 0:surfaktan uygulandı, 1: en az bir doz 100 mg/kg surfaktan uygulandı, CPAP süresi (saat), MV süresi (saat): invaziv mekanik ventilasyon süresi, UAK: umbilikal arter kateteri, UAK süresi (gün), UVK: umbilikal ven kateteri, UVK süresi (gün), Penta: 0:kullanılmadı, 1:kullanıldı, G-CSF:0:kullanılmadı, 1:kullanıldı

Tablo 4.3: Plasebo kontrol grubundaki hastaların verileri-3.

	PDA	PDA Tx	Sepsis 1	Sepsis 1 PN	Sepsis 1 üreme	Sepsis 2	Sepsis 2 üreme	Sepsis 3	Sepsis 3 üreme	NEK evre
Bebek Ş (x)1	1	1	2	18	MRKNS	0		0		2
Bebek Ş 1	1	1	1	15	0	0		0		0
Bebek Ş 2	1	1	0			0		0		0
Bebek A	1	1	0			0		0		0
Bebek E 2	0	0	0			0		0		0
Bebek E 3	0	0	2	7	MRKNS	0		0		0
Bebek Y	0	0	0			0		0		0
Bebek G	0	0	1	6	0	0		0		0
Bebek Ö	0	0	1	4	0	0		0		0
Bebek S	0	0	2	11	ESBL E.Coli	2	MRKNS	0		0
Bebek K	0	0	1	15	0	0		0		2
Bebek Ka.	1	1	0			0		0		0
Bebek K1.	0	0	0			0		0		0
Bebek D	1	0	0			0		0		0
Bebek A 2	1	1	0			0		0		0
Bebek D 1	1	0	0			0		0		0
Bebek D 2	1	0	0			0		0		0
Bebek Ç	0	0	0			0		0		0
Bebek K	1	1	2	5	Pseudomonas	0		0		0
Bebek E	1	0	0			0		0		1
Bebek Ü	0	0	2	22	MRKNS	0		0		0
Bebek Ey.	1	1	2	16	C. Parapsilosis	2	C. Parapsilosis	2	C. Parapsilosis	3
Bebek N	1	1	2	4	MRKNS	2	ESBL E.coli	2	MRKNS	3
Bebek Y	0	0	0			0		0		2
Bebek A 3	1	0	2	14	MRKNS	0		0		0

PDA: 0: yok, 1: var, PDA Tx: 0: PDA için tedavi verilmedi, 1:PDA için tedavi verildi, Sepsis 1: 1. sepsis atağı, 1: klinik sepsis, 2: kanıtlanmış sepsis, Sepsis 1 PN: 1. sepsis atağı postnatal kaçınıcı günde görüldü.

Tablo 4.4: Plasebo kontrol grubundaki hastaların verileri-4

	Oral Başlama	Full oral	TPN'li gün	Beslenme intolerans gün	Toplam AS	Toplam F	TREG 1	TREG1 zaman	TREG 2	TREG 2 zaman	Mortalite
Bebek Ş (x)1	2	28	22	12	7454	0	48,4	28,6	45,9	34,1	0
Bebek Ş 1	1	16	10	6	3367	425	34,7	29,6	56	35,4	0
Bebek Ş 2	2	15	9	2	4482	0	37,5	29,6	38,9	35,4	0
Bebek A	2	9	7	0	6820	80			52,9	36,4	0
Bebek E 2	2	10	9	4	3378	177	30,2	30,1	47,5	36	0
Bebek E 3	1	10	7	6	3091	0	46,1	30,1	42,5	36	0
Bebek Y	2	8	5	0	1585	0	30,9	34,1	30,2	36,6	0
Bebek G	2	13	11	11	2575	296	47	32,1	45,7	36,6	0
Bebek Ö	2	13	11	5	1404	0	34,6	34			0
Bebek S	2	20	19	8	3833	0	40,4	28	80	35	0
Bebek K	2	30	17	14	5277	67	26,6	31,2	34	38,4	0
Bebek Ka.	2	12	9	2	4021	0	38,2	31,1	51,7	38,6	0
Bebek Ki.	2	8	6	1	1066	0	43	34,1	40,5	38	0
Bebek D	3	14	11	0	883	237	31,7	34	31,9	38,5	0
Bebek A 2	2	10	7	7	2854	0	36,8	30	38,8	35	0
Bebek D 1	2	14	7	8	3862	22			54	38	0
Bebek D 2	2	15	8	2	4328	33			65	38	0
Bebek Ç	2	11	10	3	3145	376	41,4	30	38	34,4	0
Bebek K	2	15	13	3	3506	0	18,2	31	40,7	38	0
Bebek E	2	12	8	4	4632	0			57,5	36,1	0
Bebek Ü	2	25	15	3	8487	0	20,6	29,4	63,3	35	0
Bebek Ey.	2	58	54	30	2603	2206	34,9	27,2	53,9	37	0
Bebek N	2	30	40	27	3500	96	40,7	24,6	43,2	32	0
Bebek Y	1	19	12	6	1280	160	53,1	31,6			0
Bebek A 3	6	-	5	7	116	0	52,1	25,3			1

Oral Başlama: enteral beslenme başlama zamanı (gün), **Full oral:** tamamen enteral beslenmeye geçiş zamanı (gün), **TPN'li gün:** parenteral beslenme uygulanma süresi (gün), **Toplam AS:** yatış süresince alınan anne sütü hacmi (ml), **Toplam F:** yatış süresince alınan mama hacmi (ml), **TREG 1:** doğumda bakılan FOX P3 ekspresyonu (%), **TREG 2:** taburculukta bakılan FOX P3 ekspresyonu (%)

Tablo 4.5: Oral laktoferrin profilaksi grubundaki hastaların verileri-1.

	Cinsiyet	GH	DA	ANS	EDE	EMR	Koryo- amnionit	Pre- eklamsi	Kronik hast	Gebelikte ilaç	Doğum şekli	APGAR 1/5	SNAPPE
Bebek B	0	26,1	680	2	1	0	1	0	0	0	1	5/7	17
Bebek P	1	29,3	890	2	0	0	0	1	0	1	1	8/9	22
Bebek K	0	29,3	1030	1	1	1	0	0	0	0	0	2/7	5
Bebek K 1	1	28,4	940	2	1	1	1	0	0	1	1	7/8	10
Bebek K 2	0	28,4	1060	2	1	1	1	0	0	1	1	7/9	0
Bebek Kp 1	0	31,5	1850	2	1	0	1	0	0	1	1	8/9	0
Bebek Kp 2	0	31,5	1800	2	1	0	1	0	0	1	1	8/9	0
Bebek A	1	30,6	1870	2	1	1	0	0	0	1	0	8/10	0
Bebek Ş 1	0	28,3	1200	1	1	1	0	0	0	1	1	3/6	43
Bebek Ş 2	0	28,3	1140	1	1	1	0	0	0	1	1	6/9	14
Bebek Ş 3	1	28,3	1280	1	1	1	0	0	0	1	1	6/9	7
Bebek S 1	1	31,1	1680	0	1	0	0	0	1	1	1	8/9	0
Bebek S 2	1	31,1	1490	0	1	0	0	0	1	1	1	7/8	5
Bebek S 3	1	31,1	1300	0	1	0	0	0	1	1	1	7/8	5
Bebek Ke	0	27,5	1240	2	1	1	1	0	0	1	1	7/8	5
Bebek A.Y 1	0	31,3	1200	0	0	0	0	0	0	0	1	8/9	19
Bebek A.Y 2	0	31,3	1020	0	0	0	0	0	0	0	1	7/9	19
Bebek Ş(x) 2	1	28,2	1110	2	1	1	1	0	0	1	1	6/8	14
Bebek Ş(x) 3	0	28,2	1000	2	1	1	1	0	0	1	1	6/8	9
Bebek O	1	31,2	1270	2	0	0	0	1	0	1	1	8/9	9
Bebek T	0	26,4	790	1	1	1	0	0	0	0	1	8/9	19
Bebek C 2	1	30,3	1630	2	1	1	0	0	0	1	1	6/8	0
Bebek C 1	1	30,3	1650	2	1	1	0	0	0	1	1	6/8	7
Bebek E 1	1	30,1	1760	1	1	0	0	0	0	0	1	8/9	5
Bebek A.R 1	0	30	1470	0	1	0	0	0	0	0	0	7/9	14

Cinsiyet: 0:kız,1:erkek, ANS: 0:hiç yapılmamış, 1:eksik doz, 2:tam doz, EDE: 0:yok,1:var, EMR: 0:yok,1:var, Koryoamnionit: 0:yok, 1:var, Preeklamsi: 0:yok,1:var, Kronik hastalık: 0:yok,1:var, Gebelikte ilaç: 0:yok, 1:var, Doğum şekli: 0:NSVY, 1:CS.

Tablo 4.6: Oral laktoferrin profilaksi grubundaki hastaların verileri-2.

	RDS	CPAP süresi	MV süresi	UAK	UAK süresi	UAK üreme	UVK	UVK süresi	UVK üreme	Amp-Amino	Antib. süre	Penta	G-CSF
Bebek B	1	4	0	1	7	0	1	13	MRKNS	1	7	1	0
Bebek P	1	60	0	0			1	13	MRKNS	0	0	0	0
Bebek K	1	144	0	1	9	S.epidermidiis	1	15	KNS	1	4	1	1
Bebek K 1	1	8	0	1	5	0	0			1	5	0	0
Bebek K 2	1	8	0	1	7	MRKNS	1	7	MRKNS	1	4	1	1
Bebek Kp 1	1	56	0	0			0			1	5	0	0
Bebek Kp 2	1	40	0	0			0			1	9	0	0
Bebek A	0	0	0	0			0			1	3	1	0
Bebek Ş 1	1	208	39	1	9	0	1	9	0	1	5	1	0
Bebek Ş 2	1	14	0	0			0			1	8	1	0
Bebek Ş 3	1	10	0	0			0			1	8	0	0
Bebek S 1	1	5	0	0			0			1	8	0	0
Bebek S 2	1	48	120	0			0			1	3	0	0
Bebek S 3	1	108	0	0			0			1	3	0	0
Bebek Ke	1	2	0	0			0			1	6	1	0
Bebek A.Y 1	1	8	0	0			0			1	7	1	0
Bebek A.Y 2	1	40	0	0			0			1	1	1	1
Bebek Ş(x) 2	1	96	0	1	6	0	1	11		1	10	1	1
Bebek Ş(x) 3	1	60	0	1	2	0	1	13	KNS	1	8	1	1
Bebek O	0	0	0	0			0			0	0	0	0
Bebek T	1	4	0	1	7	B.Cepacia, Ps.aue	1	8	B.cepacia, Ps.Aur	1	8	1	0
Bebek C 2	1	4	0	0			0			1	7	0	0
Bebek C 1	1	4	0	0			0			1	6	0	0
Bebek E 1	1	16	0	0			0			1	5	0	0
Bebek A.R 1	1	4	0	0			0			1	5	0	0

RDS: 0:surfaktan uygulandı, 1: en az bir doz 100 mg/kg surfaktan uygulandı, CPAP süresi (saat), MV süresi (saat): invaziv mekanik ventilasyon süresi, UAK: umbilikal arter kateteri, UAK süresi (gün), UVK: umbilikal ven kateteri. UVK süresi (gün), Penta: 0:kullanılmadı, 1:kullanıldı. G-CSF:0:kullanılmadı, 1:kullanıldı

Tablo 4.7: Oral laktoferrin profilaksi grubundaki hastaların verileri-3.

	PDA	PDA Tx	Sepsis 1	Sepsis 1 PN	Sepsis 1 LF	Sepsis 1 üreme	Sepsis 2	Sepsis 2 LF	Sepsis 2 üreme	NEK evre
Bebek B	0	0	1	7	5	0				0
Bebek P	1	1	2	4	0	MRKNS				0
Bebek K	1	1	1	4	0	0	2	2	MRKNS	0
Bebek K 1	0	0	0							0
Bebek K 2	1	0	2	5	0	MRKNS				0
Bebek Kp 1	0	0	0							0
Bebek Kp 2	1	0	0							0
Bebek A	0	0	1	4	0	0				0
Bebek Ş 1	1	0	1	6	0	0				0
Bebek Ş 2	1	0	1	11	2	0				0
Bebek Ş 3	1	0	2	13	7	ESBL+ E.coli				0
Bebek S 1	0	0	0							0
Bebek S 2	1	1	0							0
Bebek S 3	1	0	0							0
Bebek Ke	0	0	2	10	3	ESBL+ Klebs.pneumonia				0
Bebek A.Y 1	0	0	0							0
Bebek A.Y 2	1	0	2	11	3	Enterokok fecalis	1	13	0	1
Bebek Ş(x) 2	1	1	0							0
Bebek Ş(x) 3	1	1	1	20	14	0				0
Bebek O	1	1	0							0
Bebek T	1	0	2	5	0	C.Albicans, Ps.aureginosa				0
Bebek C 2	0	0	0							0
Bebek C 1	1	1	0							0
Bebek E 1	1	0	0							0
Bebek A.R 1	1	1	0							0

PDA: 0: yok, 1: var, PDA Tx: 0: PDA için tedavi verilmedi, 1:PDA için tedavi verildi, Sepsis 1: 1. sepsis atağı, 1: klinik sepsis, 2: kanıtlanmış sepsis, Sepsis 1 PN: 1. sepsis atağı postnatal kaçınıcı günde görüldü.

Tablo 4.8: Oral laktoferrin profilaksi grubundaki hastaların verileri-4

	Oral Başla	Full oral	LF Başla	Toplam LF	TPN'li gün	Beslenme intolerans gün	Toplam AS	Toplam F	TREG 1	TREG1 zaman	TREG 2	TREG 2 zaman
Bebek B	1	18	4	53	15	6	10205	1987	43,7	26,1	67	36,3
Bebek P	2	21	4	46	18	10	3541	2896	30,8	29,4	72,5	37,4
Bebek K	2	21	18	19	19	9	7257	0	48,3	29,5	70,7	36,5
Bebek K 1	2	11	7	38	9	7	6250	0	23,8	28,4	46,3	35
Bebek K 2	2	19	9	38	18	3	5353	0	24,6	28,4	42	35
Bebek Kp 1	2	16	4	16	14	3	657	1088	27,5	31,5	64,4	36,1
Bebek Kp 2	2	11	4	16	9	2	802	1589	24,7	31,5	65,4	36,1
Bebek A	3	11	4	15	9	1	3331	0	46,8	30,6		
Bebek Ş 1	2	11	7	31	8	2	5027	588	28,2	28,3	35,9	34,1
Bebek Ş 2	2	10	9	30	7	4	5518	616	40,3	28,3	51,9	34,1
Bebek Ş 3	2	9	5	32	8	7	5750	726	26,8	28,3	60,3	34,1
Bebek S 1	2	8	3	26	7	5	5872	0	39,6	31,1	61,7	36,5
Bebek S 2	2	14	5	31	13	6	6027	0	49,7	31,1	65,7	36,5
Bebek S 3	2	12	6	24	1	12	4251	0	32,7	31,1	45,7	36,5
Bebek Ke	1	17	6	30	16	6	6630	160	37,8	27,5	38,3	34,1
Bebek A.Y 1	2	24	5	21	21	5	2748	1650			58,6	36,5
Bebek A.Y 2	6	29	7	20	27	16	1726	901			35,7	36,5
Bebek Ş(x) 2	5	16	11	23	13	8	7462	0	24,1	28,6	36,3	34,1
Bebek Ş(x) 3	7	16	11	18	15	2	7262	0	27,7	28,6	56,1	34,1
Bebek O	2	7	3	18	6	0	3114	0	30,6	31,4	40,7	38,2
Bebek T	2	11	5	37	8	0	7452	0	37,6	26,5	91	35,5
Bebek C 2	1	7	2	13	6	3	2522	30	38,5	30,3	43,1	32,3
Bebek C 1	1	7	2	12	6	4	2312	280	46,3	30,3	51,4	36,3
Bebek E 1	2	10	5	20	9	3	5168	2435	30,1	30,1	46,1	36
Bebek A.R 1	2	10	4	16	7	3	3188	0	30,8	30	53,1	35

Oral Başlama: enteral beslenme başlama zamanı (gün), **Full oral:** tamamen enteral beslenmeye geçiş zamanı (gün), **LF başla:** Laktoferrin başlanma zamanı (gün), **Toplam LF:** yatış süresince toplam kaç laktoferrin dozu aldı **TPN'li gün:** parenteral beslenme uygulanma süresi (gün), **Toplam AS:** yatış süresince alınan anne sütü hacmi (ml), **Toplam F:** yatış süresince alınan mama hacmi (ml), **TREG 1:** doğumda bakılan FOX P3 ekspresyonu (%), **TREG 2:** taburculukta bakılan FOX P3 ekspresyonu (%)

Plasebo kontrol ve oral LF profilaksi grubundaki hastalar, demografik özellikleri açısından değerlendirildiğinde; her iki gruptaki cinsiyet dağılımının, ortalama gestasyon haftalarının (sırası ile $30,3\pm2,5$ ve $29,5\pm1,6$ hafta) ve doğum ağırlıklarının (sırası ile $1307\pm262,1$ ve $1290\pm346,7$ g) benzer olduğu saptandı (Tablo 4.9).

Tablo 4.9: Plasebo kontrol ve oral laktoferrin profilaksi grubundaki hastaların demografik ve prenatal özellikleri.

	Kontrol Grubu n=25	Laktoferrin Grubu n=25	p
Cinsiyet K/ E	14 / 11	13 / 12	1
Gestasyon yaşı (hf) (Ort $\pm$ SD) (minimum-maksimum)	$30,3\pm2,5$ (24,6-34,1)	$29,5\pm1,6$ (26,1-31,5)	0,191
Doğum Ağırlığı (g) (Ort $\pm$ SD) (minimum-maksimum)	$1307\pm262,1$ (780-1860)	$1290\pm346,7$ (680-1870)	0,846
Çoğul gebelikten doğan bebek (n)	9	18	0,02
Antenatal steroid			
Tamamlanmış (n,%)	17 (68)	13 (52)	0,386
Tamamlanmamış (n,%)	3 (12)	6 (24)	
Hiç yapılmamış (n,%)	5 (20)	6 (24)	
EDE (n) (%)	17 (68)	21 (84)	0,321
EMR (n) (%)	9 (36)	13 (52)	0,393
Koryoamnionit (n) (%)	4 (16)	8 (32)	0,321
Preeklamsi/Eklamsi/HELLP (n) (%)	6 (24)	2 (8)	0,247
Plasental yetmezlik (n) (%)	5 (20)	2 (8)	0,417
Kronik hastalık (n) (%)	3 (12)	3 (12)	1
Gebelikte ilaç kullanımı (n) (%)	12 (48)	18 (72)	0,172
Doğum şekli (c/s) (n) (%)	23 (92)	22 (88)	1
1. dakika APGAR (ortanca) (minimum-maksimum)	7 (5-9)	7 (5-9)	1
5. dakika APGAR (ortanca) (minimum-maksimum)	9 (8-10)	9 (8-10)	1
SNAPPE-II (ortanca) (minimum-maksimum)	5 (0-47)	7 (0-43)	0,543

EDE: Erken Doğum Eylemi, **EMR:** Erken Membran Rüptürü, **SNAPPE-II:** Score for Neonatal Acute Physiology-Perinatal Extension-II.

Prenatal dönemle ilgili özelliklerden maternal preeklamsi, eklamsi, plasental yetmezlik, EDE, EMR, koryoamnionit açısından gruplar arasında fark tespit edilmedi (Tablo 4.9). Annede FMF, HT, DM gibi kronik hastalıklar, prenatal dönemde antihipertansif, antibiyotik ve nifedipine gibi eylem durdurmak amaçlı kullanılan ilaçlar açısından fark yoktu (Tablo 4.9). Antenatal steroid uygulaması değerlendirildiğinde; ANS yapılmamış, tek doz yapılmış ya da çift doz yapılmış olmasına rağmen yeterli süre geçmeden doğum gerçekleşen ve ANS dozları tamamlanmış olan hastalar iki grup arasında farklı değildi (Tablo 4.9).

Plasebo kontrol ve oral LF profilaksi grubundaki C/S ile doğum oranı sırası ile % 92 ve % 88 idi. Birinci ve 5. dakika APGAR skorları arasında fark yoktu. Hastaların APGAR skorları ve ilk 12 saatteki vital bulguları, kan gazı parametreleri ile hesaplanan SNAPPE-II skorlarının ortancaları plasebo kontrol ve oral LF profilaksi grubu için sırası ile 5 ve 7 idi ($p>0,05$) (Tablo 4.9).

Erken postnatal dönemdeki sorunlar açısından gruplar değerlendirildiğinde; RDS için en az bir kez 100 mg/kg dozunda surfaktan alan hasta sayısı oral LF profilaksi grubunda belirgin olarak daha yüksekti ($p=0,02$). Bununla ilişkili olarak NCPAP uygulanan hasta sayısı da oral LF profilaksi grubunda daha fazlaydı ($p=0,02$) ancak ortalama NCPAP uygulama süresi her iki grupta benzerdi. Plasebo kontrol grubunda invaziv ventilasyon tek bir hastaya, oral LF profilaksi grubunda ise iki hastaya uygulandı (Tablo 4.10).

Servis protokolleri doğrultusunda her iki grup PDA açısından postnatal 2. günde ekokardiyografi ile denetlendi. Plasebo kontrol grubunda 14, oral LF profilaksi grubunda 17 hastada PDA tespit edildi. Bunlardan hemodinamik olarak belirgin PDA'ya sahip olan her iki gruptaki dokuz hasta medikal tedavi aldı (Tablo 4.10).

Erken neonatal sepsis şüphesi ile plasebo kontrol grubunda 17, oral LF profilaksi grubunda 23 hastaya ampisilin+aminoglikozid kombinasyonu başlandı ve sırasıyla ortalama $5,5\pm2,1$ ve $5,9\pm2,2$ gün kullanıldı (Tablo 4.10).

Çalışmaya dahil edilen hastalar beslenme özellikleri açısından değerlendirildi. Parenteral beslenme her iki gruptaki bebeklere doğduklarında başlandı ve enteral beslenme günlük toplam sıvının %75'ini aşınca kadar sürdürüldü. Grup 1 ve

2'deki hastalarda parenteral nutrisyon süresi $13,3 \pm 11,2$ ve $11,9 \pm 5,5$ gün ile benzerdi (Tablo 4.11).

Tablo 4.10: Plasebo kontrol ve oral laktoferrin profilaksi grubundaki hastaların erken postnatal dönemdeki sorunlar açısından değerlendirilmesi.

	Kontrol Grubu n=25	Laktoferrin Grubu n=25	p
Surfaktan uygulanan hasta (n) (%)	15 (60)	23 (92)	0,02
İnvaziv MV yapılan hasta (n) (%)	1 (4)	2 (8)	1
İnvaziv MV süresi (saat)	336	39 ve 120	
nCPAP yapılan hasta (n) (%)	15 (60)	23 (92)	0,02
nCPAP süresi (saat) (ort $\pm$ SD) (minimum-maksimum)	29,1 $\pm$ 37,5 (2-120)	42,6 $\pm$ 52,3 (2-208)	0,392
PDA tespit edilen hasta (n) (%)	14 (56)	17 (68)	0,565
Medikal PDA tedavisi uygulanan hasta (n) (%)	9 (36)	9 (36)	1
Ampisilin-aminoglikozid kullanılan hasta (n) (%)	17 (68)	23 (92)	0,079
Ampisilin-aminoglikozid kullanım süresi (gün) (ort $\pm$ SD) (minimum-maksimum)	5,5 $\pm$ 2,1 (2-10)	5,9 $\pm$ 2,2 (1-10)	0,632

MV: Mekanik ventilasyon, PDA: patent duktus arteriozus

Enteral beslenme trofik beslenme şeklinde başlanıp, kademeli artırıldı. İki grup arasında beslenmeye başlama zamanı açısından fark tespit edilmedi. Günlük beslenme hacmi 20 ml/kg/gün'e ulaştığında plasebo kontrol grubunda SF, oral LF profilaksi grubunda ise LF, AS veya mamaya eklenmeye başlandı, iki grup arasında SF veya LF başlanma zamanları arasında fark yoktu (Tablo 4.11).

Grupların yatış süresince beslenme içerikleri ve hacimleri değerlendirildiğinde; Grup 1 ve Grup 2'deki hastaların hepsinin AS ile beslendiği, grup 1'de hastaların 2/3'ü ile grup 2'deki hastaların ise 1/2'sinin yalnız AS ile beslendiği görüldü. Anne sütü+mama ile beslenen hastaların aldıkları anne sütü hacminin toplam beslenme hacmine oranı hesaplandığında, Grup 1'deki sadece bir

hastada total beslenme hacminin % 55'ini anne sütünün oluşturduğu, diğer 8 hastada ise bu oranın $\geq$ %80 ve üzerinde olduğu saptandı. Aynı değerlendirme Grup 2'deki hastalar için yapıldığında sadece 6 hastanın beslenme içeriğinin $\geq$ %80 anne sütü olduğu bulundu, ancak gruplar arasında fark saptanmadı (Tablo 4.11).

Tablo 4.11: Plasebo kontrol ve oral laktoferrin profilaksi gruplarının beslenme özellikleri açısından değerlendirilmesi.

	Kontrol Grubu (n=25)	Laktoferrin Grubu (n=25)	p
TPN kullanılan gün (ort±SD) (minimum-maksimum)	13,3±11,2 (5-54)	11,9±5,5 (6-27)	0,770
Oral başlama zamanı (gün) (ort±SD) (minimum-maksimum)	2,1±0,9 (1-6)	2,4±1,5 (1-7)	0,772
SF veya LF başlama zamanı (gün) (ort±SD)(minimum-maksimum)	5,7±3,9 (3-15)	6±3,5 (2-18)	0,887
Alınan LF miktarı (mg) (ort±SD) (minimum-maksimum)	-	5144±2130 (2400-10600)	
Beslenme içeriği: Sadece anne sütü (n)(%) Anne sütü+mama (n)(%)	16 (64) 9 (36)	13 (52) 12 (48)	0,567
Anne sütünün oranı (%) (ort±SD) (minimum-maksimum) / (ortanca)	89,9±12,9 (54-99) / 92,3	78,7±22,1 (34-99) / 88,9	0,286
Yatış süresince alınan ortalama AS hacmi (ml/gün)(ort±SD)(minimum-maksimum)	126,5±46,8 (8,3-206,7)	152,2±22 (119-205,7)	0,08
Yatış süresince alınan ortalama F hacmi (ml/gün)(ort±SD)(minimum-maksimum)	11,4±9,1 (1,1-31,5)	37,17±27,3 (3,81-93,5)	0,009
Tamamen oral beslenmeye geçiş zamanı (gün)(ort±SD)(minimum-maksimum)	17,3±10,7 (8-58)	13,8±5,7 (7-29)	0,158
O/G drenajda geçirilen gün sayısı (ort±SD)(minimum-maksimum)	3,4±6,3 (0-25)	0,8±1,5 (0-6)	0,041
O/G drenaj indeksi (%) (ort±SD) (minimum-maksimum)	8,2±11,9 (0-43)	1,8±3,8 (0-16)	0,026
Kusma görülen gün sayısı (ort±SD) (minimum-maksimum)	4±4,1 (0-11)	3,4±3,1 (0-11)	0,592
Kusma indeksi (%) (ort±SD) (minimum-maksimum)	11,7±12,9 (0-42)	10,3±9,6 (0-39)	0,657
Rezidülü gün sayısı (ort±SD) (minimum-maksimum)	1,9±3,4 (0-15)	0,84±1,6 (0-6)	0,131
Rezidü indeksi (%) (ort±SD) (minimum-maksimum)	5,6±7,9 (0-33)	2,4±4 (0-12)	0,101

TPN: Total parenteral nutrisyon, PN: Post natal, LF: Laktoferrin, SF: Serum fizyolojik, AS: Anne sütü, F: Mama, O/G: orogastrik

Hastanede yatış süresince günlük alınan ortalama anne sütü ve mama miktarları karşılaştırıldığında, oral LF profilaksi grubunun günlük hacim olarak daha fazla beslendiği, günlük anne sütü alımları arasında istatistiksel fark olmamasına rağmen, günlük mama alımının plasebo kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla olduğu bulundu ($p=0,009$).

Tam enteral beslenmeye Grup 1 ve 2'de sırası ile ortalama $17,3\pm10,7$ ve $13,8\pm5,7$ günde geçildi ($p=0,158$) (Tablo 4.11).

Geç neonatal sepsis gelişimi için tanımlanmış risk faktörleri değerlendirildi. Umbilikal arter kateterizasyonu Grup 1 ve 2'de sırası ile 3/25 ve 8/25 hastada, umbilikal ven kateterizasyonu ise 6/25 ve 8/25 hastada uygulanmıştı (Tablo 4.12). Plasebo kontrol grubundaki arter kateterlerinde üreme olmazken, oral LF profilaksi grubundaki sekiz kateterden üçünde *S. Epidermidis*, *MRKNS*, *B.cepacia*, *P. Aureginosa* üredi. Umbilikal ven kateterlerinde mikroorganizma üremesi, Grup 1 ve 2'de sırası ile 2/25 ve 6/25 hastada tespit edilmiştir. Grup 1'deki bir, grup 2'deki üç hasta eş zamanlı kateter ve periferden alınan kan kültüründe *MRKNS* ve *Pseudomonas aureginosa* üremesi nedeniyle kateter kaynaklı sepsis olarak değerlendirilmiştir. Oral LF profilaksi grubunda kateter kaynaklı kabul edilen GNS atakları bu hastalar henüz oral LF profilaksisi almadan gelişmiştir. Profilaksi alan hiçbir hastada kateter kaynaklı sepsis gelişmemiştir. Umbilikal arter ve ven kateterlerinin kullanım süresi iki grupta benzerdi (Tablo 4.12).

Sepsisli hastalarda immünmodulator etkileri nedeniyle kullanılan IgM'den zenginleştirilmiş IV Ig ve G-CSF kullanımı açısından gruplar değerlendirildiğinde, bu iki ilaç, iki grupta da eşit sayılarda kullanılmıştı (Tablo 4.12). Her iki grupta sepsis şüphesi ve kanıtlanmış sepsis nedeniyle antibiyotik kullanım süreleri benzerdi (Tablo 4.12).

Hastanede yatış süresi oral LF profilaksi grubunda, plasebo kontrol grubuna göre daha uzun olmasına rağmen, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi.

Tablo 4.12: Geç neonatal sepsis için plasebo kontrol grubu ve oral laktoferrin profilaksi grubundaki risk faktörlerinin değerlendirilmesi.

	Kontrol Grubu (n=25)	Laktoferrin Grubu (n=25)	p
Umbilikal arter kateterli hasta (n) (%)	3 (12)	8 (32)	0,172
Umbilikal arter kateterli gün (ort±SD) (minimum-maksimum)	8,3±4,9 (5-14)	6,5±2,3 (2-9)	0,400
UAK'de mikroorganizma üremesi	0	3 (37,5)	0,491
Üreyen mikroorganizmalar		S. epidermidis/ MRKNS ^a B.cepacia, P.aureginosa ^a	
Umbilikal ven kateterli hasta	6 (24)	8 (32)	0,753
Umbilikal ven kateterli gün (ort±SD) (minimum-maksimum)	11±3,7 (6-16)	11,1±2,8 (7-15)	0,540
UVK'de mikroorganizma üremesi	2 (33,3)	6 (66,7)	0,277
Üreyen mikroorganizmalar	S. epidermidis/ MRKNS ^a	MRKNS/ MRKNS ^b / KNS/ MRKNS ^a / KNS/B.cepacia, P.aureginosa ^a	
TPN kullanılan gün (ort±SD) (minimum-maksimum)	13,3±11,2 (5-54)	11,9±5,5 (6-27)	0,770
IgM ile zenginleştirilmiş IV Ig kullanılan hasta sayısı (n) (%)	13 (52)	13 (52)	1
G-CSF kullanılan hasta sayısı (n) (%)	6 (24)	6 (24)	1
Antibiyotikli gün sayısı (ort±SD) (minimum-maksimum)	15,1±13,9 (0-62)	15,7±9,4 (0-35)	0,859
Hastanede yatış gün sayısı (ort±SD) (minimum-maksimum)	32,4±18,5 (12-92)	36,4±14,1 (16-66)	0,395

UAK: Umbilikal arter kateteri, UVK: Umbilikal ven kateteri, TPN: Total parenteral nutrisyon, IgM: İmmunglobulin M, G-CSF: Granülosit-koloni stimüle edici faktör.

^a : Umbilikal arter, umbilikal ven kateterleri ve periferik kan örneğinde eş zamanlı üreyen mikroorganizmalar

^b : Umbilikal ven kateteri ve periferik kan örneğinde eş zamanlı üreyen mikroorganizmalar

Hastalar geç neonatal sepsis atakları açısından değerlendirildi (Tablo 4.13). Plasebo kontrol grubunda 12 hastada toplam 18 sepsis atağı gözlemlendi, bunların dördü klinik sepsis iken, 14'ü kanıtlanmış sepsisti. Oral LF profilaksi grubunda ise 12

hastada 7'si kanıtlanmış toplam 14 sepsis atağı gözlemlendi. Laktoferrin kullanımının GNS'i engelleyici etkisi değerlendirilmek istendiği için oral LF profilaksi grubundaki hastaların 1. GNS atağına kadar kaç doz LF aldıkları incelendi. Bu gruptaki 5 hasta daha hiç oral LF profilaksisi almadan sepsis geçirdikleri için bu hastalar değerlendirme dışı bırakıldı. Buna göre oral LF profilaksi grubunda 7 hasta toplam 8 GNS atağı geçirmişti. Bu sekiz atağın dördü klinik, dördü kanıtlanmış sepsis atağıydı. Kanıtlanmış sepsis atak sayıları karşılaştırıldığında oral LF profilaksi grubunda daha az sayıda atak geçirilmişti ($p=0,032$).

Tablo 4.13: Plasebo kontrol ve oral laktoferrin profilaksi grubunda görülen geç neonatal sepsis atakları.

	Kontrol Grubu (n=25)	Laktoferrin Grubu (n=20)	P
GNS gelişen hasta sayısı	12	7	0,566
Toplam GNS atak sayısı	18	8	0,063
Kanıtlanmış sepsis gelişen hasta sayısı	8	4	0,572
Kanıtlanmış sepsis sayısı	14	4	0,032
1. GNS atağı	12	7	0,566
Klinik sepsis	4	3	1
Kanıtlanmış sepsis	8	4	0,572
PN kaçınıcı gün(ortanca) (minimum-maksimum)	12,5 (4-22)	11 (7-20)	0,780
Kullanılan LF dozu (mg)		400-2800	
2. GNS	3	1	0,617
Klinik sepsis	0	1	0,444
Kanıtlanmış sepsis	3	0	0,242
Kullanılan LF dozu (mg)		2600	
3. GNS	2	0	0,495
Klinik sepsis	0		
Kanıtlanmış sepsis	2		
4.GNS	1	0	
Klinik sepsis	0		
Kanıtlanmış sepsis	1		

GNS: Geç neonatal sepsis, LF: laktoferrin

Birinci GNS ataklarının klinik ve kanıtlanmış sepsis sayıları Grup 1 de sırası ile 4 ve 8 iken, Grup 2’de 3 ve 4 idi. Postnatal görülme zamanlarının ortancaları Grup 1’de 12,5 gün, Grup 2’de 11 gündü ($p=0,780$).

İkinci GNS atakları değerlendirildiğinde plasebo kontrol grubunda üç hastada kanıtlanmış sepsis atağı, oral LF profilaksi grubunda bir klinik sepsis atağı saptandı. Klinik sepsis gelişen hasta 2600 mg LF almıştı. Üçüncü ve 4. GNS atakları sadece plasebo kontrol grubunda sırası ile 2 ve 1 hastada görüldü.

Geç neonatal sepsise neden olan organizmalar değerlendirildiğinde, iki gruptaki etyolojik ajanlar ve oranları arasında fark tespit edilmedi (Tablo 4.14). Oral LF profilaksi grubunda kandida üremesi tespit edilmedi.

Tablo 4.14: Plasebo kontrol ve oral laktoferrin profilaksi grubundaki GNS ataklarına sebep olan mikroorganizmalar ve dağılımları.

		Kontrol grubu n=14 (%)	Laktoferrin grubu n=4 (%)
Gram pozitif	MRKNS	7 (50)	1 (25)
	Enterokok	-	1 (25)
Gram negatif	ESBL(+) E.Coli	3 (21,4)	1 (25)
	ESBL(+)Kl. Pneumonia	-	1 (25)
	Pseudomonas	1 (7,1)	-
Candida	C Parapsilosis	3 (21,4)	-

MRKNS: Metisilin dirençli koagülaz negatif stafilokok,
ESBL: geniş beta laktamaz direnci

Nekrotizan enterokolit gelişme açısından iki grup değerlendirildiğinde plasebo kontrol grubunda 6 (% 24), oral LF profilaksi grubunda 1 (% 4) hastada NEK gelişti. Bell evrelemesine göre sınıflandırıldığında plasebo kontrol grubundaki ciddi NEK’li (evre 2 ve 3) hasta sayısının 5 (% 20), oral LF profilaksi grubunda ise 0 olduğu görüldü (Tablo 4.15).

Tablo 4.15: Plasebo kontrol ve oral laktoferrin profilaksi grubunda nekrotizan enterokolit evreleri ve mortalite.

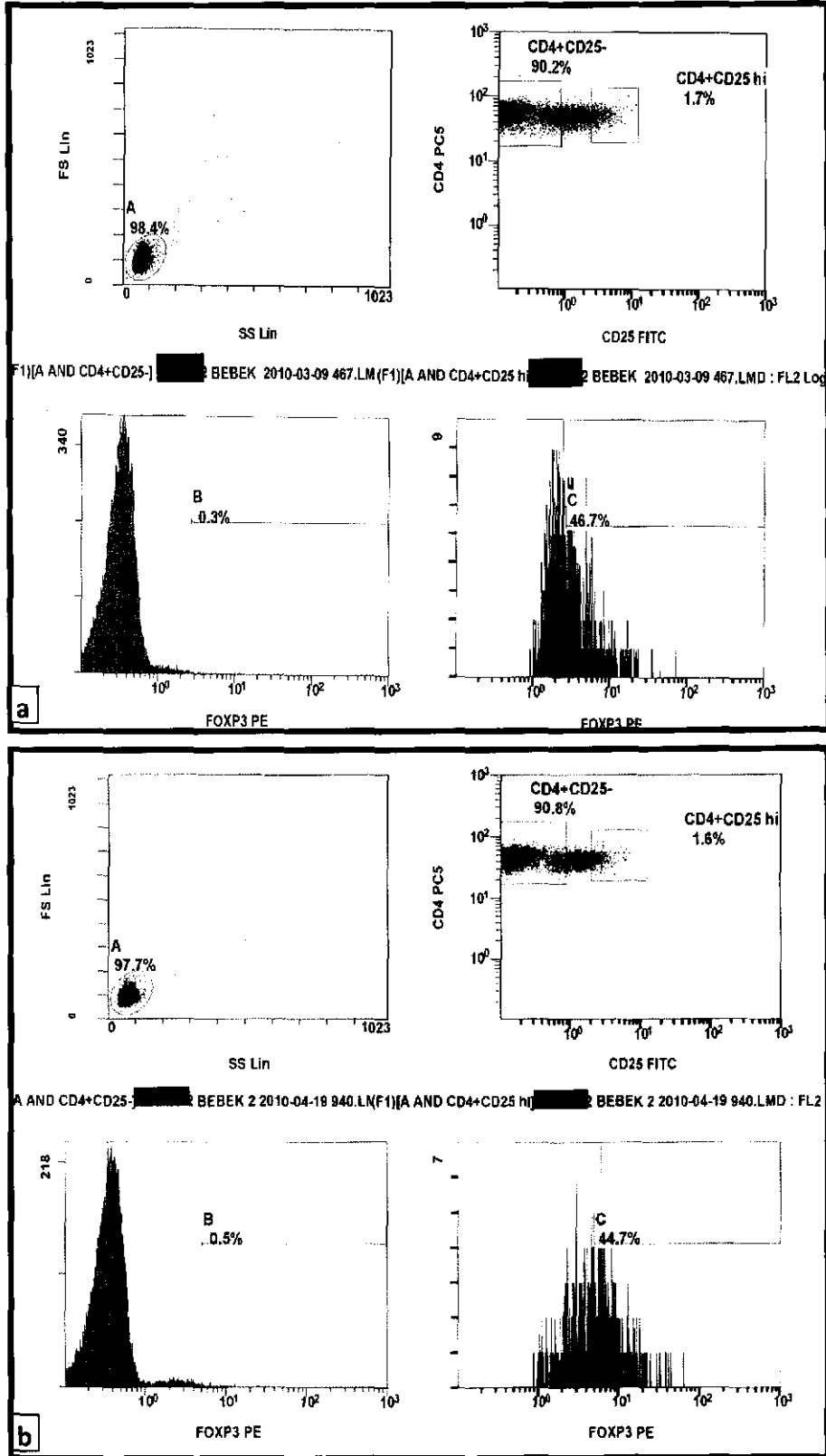
	Kontrol Grubu (n=25)	Laktoferrin Grubu (n=25)	P
NEK'li hasta sayısı (n) (%)	6 (24)	1 (4)	0,098
Evre 1 NEK'li hasta sayısı (n) (%)	1 (4)	1 (4)	1
Evre 2 NEK'li hasta sayısı (n) (%)	3 (12)	0	0,235
Evre 3 NEK'li hasta sayısı (n) (%)	2 (8)	0	0,490
Evre 2 ve 3 NEK'li hasta sayısı (n) (%)	5 (20)	0	0,05
Mortalite (n) (%)	1 (4)	0	1

NEK: nekrotizan enterokolit

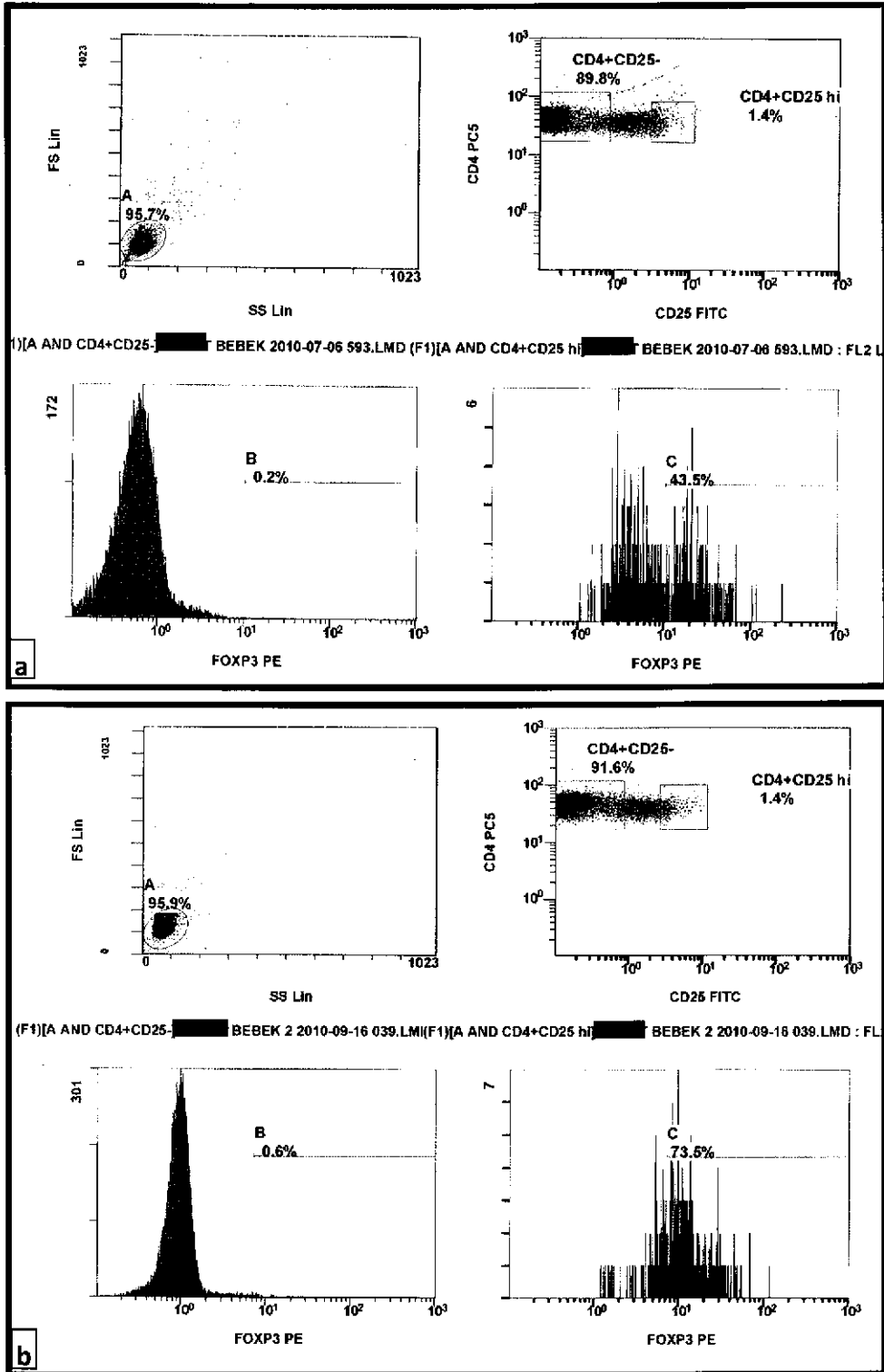
Çalışma süresince sepsise bağlı hasta mortalitesi olmadı. Kaybedilen tek hasta plasebo kontrol grubundan, 25,3 hafta-780 g ağırlığındaki Bebek A. idi. Bu hasta postnatal 14. gününde intrakranial kanama, böbrek yetmezliği ve şok tablosu ile kaybedildi.

Oral LF profilaksisinin regülatuar T hücreler üzerine etkisi olup olmadığını göstermek amacı ile doğumda ve taburculuk sonrası CD4+CD25+ hücrelerde FOXP3 ekspresyonu değerlendirildi. Plasebo kontrol ve oral LF profilaksi gruplarından birer hastanın akım sitometri görüntüleri sırası ile Şekil 4.2 ve 4.3'de verilmiştir.

Doğumdaki ve taburculuk sonrası değerler açısından gruplar arasında anlamlı fark yoktu. Artan postnatal yaşla birlikte FOXP3 ekspresyonunda her iki grupta anlamlı yükselme vardı (Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6), ancak bu yükselme profilaktik olarak LF alan grupta çok daha belirgindi ($p=0,011$ vs $p<0,0001$). Bireysel olarak FOXP3 ekspresyonundaki değişimler yüzde olarak hesaplandığında; oral LF profilaksisi alan grubun ortancası % 5,4, plasebo kontrol grubunun % 53,2 idi ($p=0,01$) (Tablo 4.16).



Şekil 4.2: Plasebo kontrol grubundan bir hastanın akım sitometri görüntüleri.
a) doğum, b) taburculuk sonrası

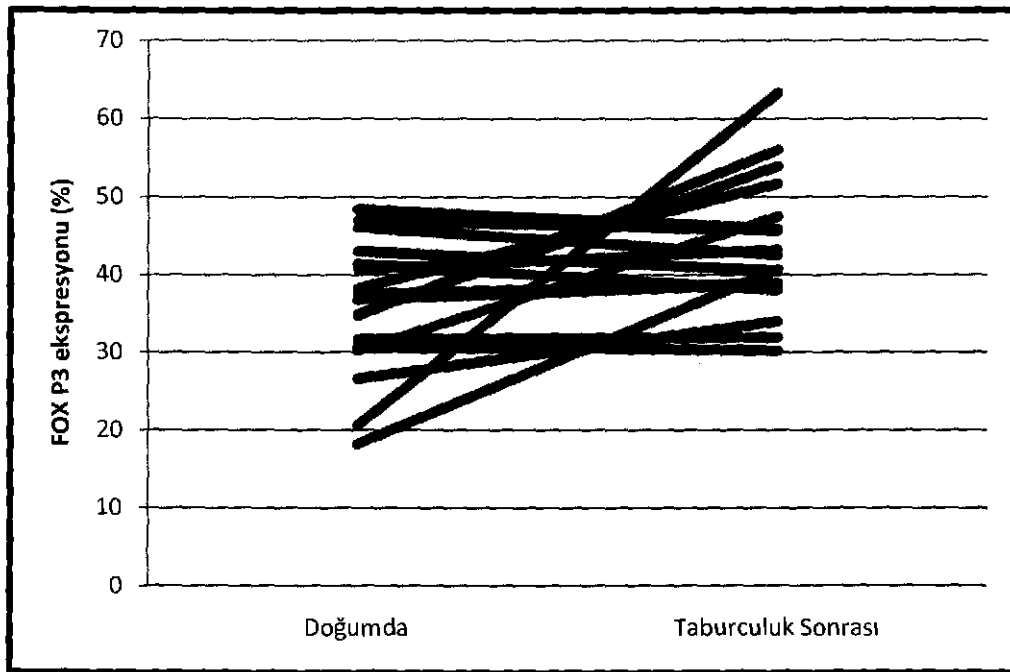


Şekil 4.3: Oral laktoferrin profilaksi grubundan bir hastanın akım sitometri görüntüleri, a) doğum, b) taburculuk sonrası

Tablo 4.16. Plasebo kontrol ve oral laktoferrin profilaksi grubundaki hastaların doğumda ve taburculuk sonrası CD4+CD25+ hücrelerinde FOXP3 ekspresyonu.

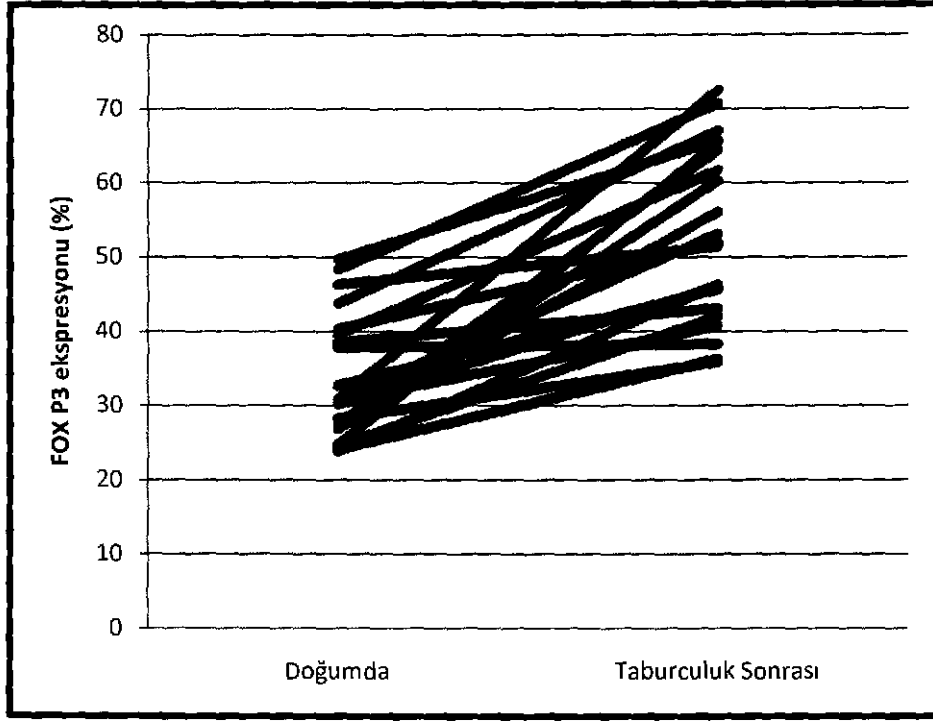
Gruplar	Doğumda	Taburculuk Sonrası	p ^a	Yüzde Değişim (ortanca, min-maks)
Kontrol grubu	37,5±9,3 (18,2-53,1)	47,8±12 (30,2-80,0)	0,011	5,4 (-8,2 – 123,6) ^b
Laktoferrin grubu	34,4±8,4 (23,8-49,7)	54,2±14,0 (35,7-91,0)	<0,0001	53,2 (1,3-142) ^b

a: Gruplar içerisinde işlem öncesi ve işlem sonrası arasında yapılan karşılaştırmalar, b: işlem öncesine göre işlem sonrası Treg'deki yüzdesel değişimler gruplar arasında farklı bulundu (p=0,01).



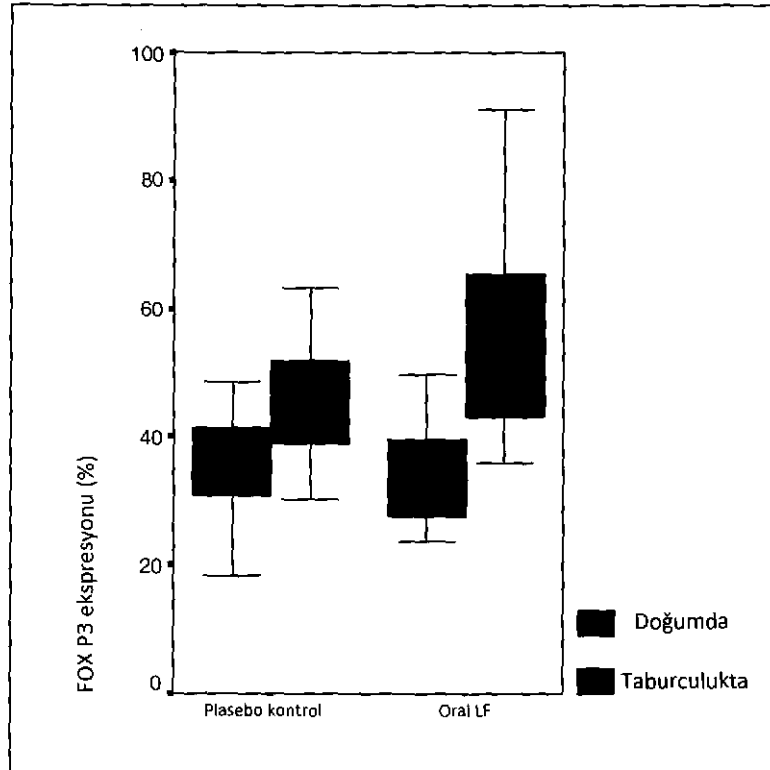
Şekil 4.4: Plasebo kontrol grubunun doğumda ve taburculuk sonrasındaki FOXP3 değerleri (%).

Grupların doğumda bakılan FOXP3 ekspresyon değerleri preeklamtik hastalar iki gruptan da çıkarıldıktan sonra yeniden değerlendirildi. Grup 1 ve 2'de sırası ile ortalama FOXP3 ekspresyonu $36,6 \pm 10,2$ ve $33,8 \pm 7,4$ olarak hesaplandı ve istatistiksel fark tespit edilmedi (p=0,534).



Şekil 4.5: Oral laktoferrin profilaksi grubunun doğumda ve taburculuk sonrasındaki FOXP3 değerleri (%).

Şekil 4.6: Plasebo kontrol ve oral laktoferrin profilaksi gruplarının doğumdaki ve taburculuk sonrası ölçülen FOXP3 (%) değerleri.



5. TARTIŞMA

Çok düşük doğum ağırlıklı prematürelde, hem mortalite hem de uzun dönem morbiditeler için belirleyici faktörlerden doğum ağırlığı, gebelik haftası, ANS uygulaması, uzamış EMR, koryoamniyonit varlığı, RDS, PDA, invaziv ventilasyon uygulaması, kateter varlığı ve süresi, antibiyotik kullanımı, enteral ve parenteral beslenme, anne sütü ile beslenme, GNS ve NEK için de risk durumunu belirlemektedir.

Gebeliğin 24-34. haftasında gerçekleşmesi beklenen prematüre doğumlarda “Anneye doğumdan 24 saat önce 24 mg Antenatal Steroid (ANS) uygulanmasının”, prematüre bebekte RDS’yi % 36, serebral kanamayı % 70, mortaliteyi % 37, NEK’i, enfeksiyöz morbiditeleri ve solunum destek ihtiyacını ise belirgin azalttığı gösterilmiş ve bu uygulama prematüre bebekte bakım standardı haline gelmiştir (125). Çalışma grubumuzu oluşturan tüm hastalar ANS yapılması önerilen gebelik haftasında doğmalarına rağmen, ancak % 60’ında doğumdan önce ANS kürü tamamlanmıştı ve bu oran “SUPPORT” çalışmasındaki gibi literatürdeki çeşitli ÇDDA çalışmalarındaki % 70’den daha düşüktü (126,127).

Avrupa’da % 5-9, ABD’de % 12-13 sıklıkta saptanan prematüre doğumların % 30-35’i anne ya da bebeğin hastalığına bağlı görülürken, % 40-45’i spontan erken doğum eylemi, % 25-30’u ise EMR’ye ikincil gerçekleşmektedir (128,129). Erken doğum eylemi, EMR ve koryoamniyonit varlığı gibi prenatal faktörler postnatal dönem için önemli belirleyicilerdir. Klinik veya subklinik koryoamniyonit sadece preterm doğuma sebep olmakla kalmayıp, neonatal sepsise, periventriküler lökomalazi, serebral palsy, bronkopulmoner displazi ve NEK gibi çok ciddi neonatal sekillere ve mortaliteye sebep olabilmektedir. Çalışma gruplarımızı erken doğum eylemi, EMR ve koryoamniyonit açısından değerlendirdiğimizde gruplar arasında fark yoktu.

Kronik hastalık (diyabet, FMF, kronik hipertansiyon), gebeliğe bağlı (gestasyonel diyabet, gestasyonel hipertansif durumlar vb.) nedenlerle ya da erken doğum eylemi, EMR, koryoamniyonit nedeniyle gebelik döneminde ilaç kullanımının sepsis ve NEK gelişimine etkisiyle ilgili yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar bulunmuştur. August Fuhr ve ark.’nın yaptıkları çalışmada maternal antibiyotik

kullanımının doğumu yedi güne kadar geciktirerek, neonatal enfeksiyonları, RDS, IVK ve NEK'i azalttığı gösterilmiştir (129). Benzer şekilde kalsiyum kanal blokörlerinin erken doğumu durdurmak için kullanımının doğum zamanını geciktirerek RDS, IVK ve NEK'i azalttığı gösterilmiştir (130,131). Buna karşılık Fanaroff ve ark'nın ABD verilerini analiz ettikleri çalışmada maternal antibiyotik ve ANS kullanımının yıllar içerisinde artmış olması, GNS ve NEK oranlarını değiştirmemiştir (132). Çalışma grubumuzdaki hastaları değerlendirdiğimizde gruplar arasında kronik hastalıklar ve ilaç kullanımı açısından fark tespit edilmedi.

Maternal preeklamsi, preterm doğumların sık görülen sebeplerindendir ve spontan erken doğum eylemi ile birlikte hipertansif bozukluklar gelişmekte olan ülkelerdeki perinatal ölümlerin en önemli belirleyicileridir (133,134). Preeklamtik anne bebeklerinde beslenme problemlerinin daha fazla görüldüğü, bunun hastanede yatış süresini uzattığı (135), NEK oranının daha yüksek olduğu gösterilmiştir (136). Çalışmamızda plasebo kontrol grubunda istatistiksel fark olmamakla birlikte daha fazla preeklamtik anne bebeği vardı ancak bu grupta ciddi NEK gelişen hastaların hiçbirisi bu bebeklerden biri değildi. Bunun dışında gebelikle ilişkili hipertansif bozuklukları olan anne bebeklerin yaklaşık yarısında nötropeni ($ANS < 1500/mm^3$) görülebilmektedir. Bu nedenle erken neonatal sepsisin daha sık görüleceği düşünülebilir. Ancak, neonatal nötropeni ve sepsisin ilişkisini değerlendiren çalışmaların sonucu birbirinden oldukça farklıdır. Son olarak yayınlanan ve 308'i preeklamtik anne bebeği olmak üzere 911 ÇDDA prematüreyi içeren çalışmada geç neonatal sepsis ile preeklamtik anne bebeği olmak, nötropenik doğmak arasında ilişki olmadığı gösterilmiştir (137). Benzer bir başka çalışmada ise preeklamtik anne bebeklerindeki nötropeni ile nozokomiyal enfeksiyon sıklığında artış gösterilemediği için rutin G-CSF kullanımı önerilmemektedir (138). Yenidoğan bakım protokolleri paralelinde G-CSF sadece sepsis durumunda $ANS < 1250/mm^3$ ise uygulanmaktadır ve çalışma gruplarımızda G-CSF uygulanan hasta sayısı eşittir.

Neonatal sonuçları ölçmek, tahmin edebilmek, hastanın ciddiyetini değerlendirebilmek, klinik araştırmalarda çalışma gruplarını karşılaştırabilmek ve YDYBÜ'lerinin performanslarını değerlendirmek ve karşılaştırabilmek için geliştirilen skora sistemlerinden ilk 12 saatteki fizyolojik parametreler ile hesaplanan SNAPPE-II skorları, iki grup arasında farklı değildi. Bu da basit

randomizasyon uygulayarak belirlediğimiz hasta grubumuzun iki gruba dağılımında ilk 12 saat parametreleri açısından fark olmadığını göstermektedir.

Çalışmamızdaki bebeklerin erken postnatal dönemdeki sorunlarını incelediğimizde en az bir kez surfaktan alan bebek sayısı oral LF grubunda istatistiksel olarak daha fazlaydı. Servis protokolleri gereği, 28 haftadan küçük tüm prematüreler ve 28-30 hafta arasında doğan ancak ANS kürü tamamlanmamış olan tüm bebeklere profilaktik olarak surfaktan uygulanması, daha az sayıda bebeğe ventilasyon desteği ve bununla birlikte invaziv girişim ihtiyacında azalmayı sağlamaktadır (139-141). Grupları bu açıdan incelediğimizde; 28 hafta altında doğan hasta sayısı plasebo kontrol grubunda beş iken, oral LF profilaksi grubunda 12 idi. Ayrıca LF profilaksi grubunda ANS kürü tamamlanmamış daha fazla sayıda hasta vardı. Benzer şekilde bu grupta surfaktan sonrası NCPAP uygulanan hasta sayısı istatistiksel olarak daha fazlaydı. İstatistiksel fark bulunmamakla birlikte Grup 2’de daha fazla hastanın daha uzun süreyle NCPAP desteği aldığı görüldü. Son yıllarda ÇDDA’lı bebeklerde kullanımı BPD’yi, ROP’u, IVK’yı ve hastanede kalış süresini azaltmakla ilişkilendirildiği için NCPAP uygulaması küçük prematüreler için bakım standartları arasına girmiştir (141-143). Ancak buna karşılık NCPAP kullanımının NEK insidansını arttırdığı bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Bunun NCPAP esnasında, postnatal intestinal gelişim için önemli olan “superior mezenterik arter”deki akımda meydana gelen azalma ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (144-146). Bizim çalışmamızda ise NCPAP’ın daha fazla ve daha uzun süre uygulandığı oral LF profilaksi grubunda sadece bir hastada evre 1 NEK görülmüştür. Mekanik ventilasyon desteği açısından bakıldığında ise hastalarımızdan sadece üçüne (Grup 1’den bir, Grup 2’den iki hasta) invaziv mekanik ventilasyon uygulanmıştır.

Çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerde yaşamın 3. günündeki insidansı % 30 olan PDA (147), hemodinamik belirgin sol-sağ şanta sebep olarak IVK, NEK, BPD ve ölüme neden olabilmektedir (148,149). Ayrıca PDA’nın tedavisinde kullanılan prostoglandin sentez inhibitörleri de vazokonstriksiyona neden olarak, zaten PDA’nın sebep olduğu azalmış lokal perfüzyonu biraz daha bozup NEK gelişimini arttırabilmektedir (150). 2010 yılındaki metaanalizde, PDA tedavisinde kullanılan ibuprofen ve indometazin duktusu eşit oranlarda kapattığı ancak daha az renal yetmezlik ve NEK, spontan perforasyon gibi GIS komplikasyonlarının daha az

görülmesi nedeniyle ibuprofenin kullanımı önerilmektedir (151). Çalışmamızda, gruplarda sırası ile 14 (% 56) ve 17 (% 68) hastada PDA tespit edilmiş olup bunlardan her iki grupta da hemodinamik olarak belirgin duktusu olan dokuz hastaya medikal tedavi uygulanmıştır. Patent duktus arteriozusa sahip ve medikal tedavi uygulanan hasta sayısı eşit olduğu için NEK gelişimi için hem PDA'nın, hem de buna yönelik uygulanan medikal tedavinin çalışma sonuçlarımızı etkilemeyeceği düşünülmüştür.

Antibiyotikler YDYB ünitelerinde en sık kullanılan ilaçlardır. Erken neonatal dönemde ÇDDA'lı bebeklerde alınan kültürlerde üreme olması ve kültürle kanıtlanmış sepsis olması çok nadir olmasına rağmen antibiyotik kombinasyonları ampirik olarak kullanılmaktadır (152). Yapılan çok merkezli bir çalışmada 4039 aşırı düşük doğum ağırlıklı bebeğin % 96'sına ikili antibiyotik kombinasyonu başlandığı ve % 83'ünde bu kombinasyonun ampisilin+gentamisin olduğu görülmüştür (153). Clark ve ark.'nın 2006 yılında yaptıkları çalışmada, bu ampirik antibiyotik kombinasyonundaki gentamisini, sefotaksim ile değiştirmenin mortaliteyi arttırdığı gösterilmiştir (154). Aynı zamanda ampirik olarak başlanan bu antibiyotiklerin süresi de önemlidir. Antibiyotik cinsi ve süresi neonatal bağırsakların kolonizasyonunu etkilemektedir. Kolonizasyon bağırsakların fizyolojik ve immünolojik gelişimi ve besinlerin emilimi için önemlidir. Cotten ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, merkezler arasında farklılık göstermekle birlikte ampirik antibiyotik kullanım süresinin ortalama 5 gün olduğu bulunmuştur (153). Aynı çalışmada kültürlerinde üremesi olmayan bir bebeğe verilen antibiyotiklerin NEK ve ölüm insidansını her antibiyotikli gün için sırası ile 1,07 ve 1,16 kat arttırdığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda gruplar arasında antibiyotik kullanılan hasta sayısı ve süreleri açısından fark yoktu.

Parenteral beslenme ÇDDA bebeklerde yapılan tüm çalışmalarda geç neonatal sepsis için risk faktörlerinden biri olarak bildirilmiştir. Parenteral beslenmenin süresinin uzaması, enfeksiyon ve metabolik komplikasyonlara yol açarak, mortaliteyi, hastanede yatış süresini, büyüme ve gelişmeyi olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir (155). Çalışma gruplarındaki hastaların tamamına doğdukları andan itibaren başlanan parenteral beslenmenin, ortalama devam süreleri arasında fark yoktu.

Çalışmaya dahil olan tüm bebeklere ortalama 2. günlerinde minimal enteral beslenme şeklinde AS başlanmış ve beslenme toleransları doğrultusunda günlük beslenme hacmi 20 ml/kg artırılarak devam edilmiştir. Çalışmamızda gruplar arasında tamamen enteral beslenmeye geçiş süresi arasında istatistiksel olarak fark bulunmamakla birlikte, bunun plasebo kontrol grubunda daha geç olduğu görüldü. ÇDDA bebeklerde tamamen enteral beslenmeye geçiş zamanlaması ile ilgili literatürde yapılmış çok sayıda çalışma mevcuttur. 2008 yılında yapılan bir çalışmada total beslenmenin >% 50'si AS olan grubun, 100 ml/kg/gün ve 150 ml/kg/gün beslenme hacmine ortalama ulaşma zamanı sırası ile 15 ve 22 gün olarak bildirilmiştir (156). Bizim çalışmamızdaki iki grubun da AS ile beslenme oranları >% 50 idi, ve her iki grubumuzun da tamamen enteral beslenmeye geçiş zamanları (140 ml/kg/gün) Grup 1 ve 2 için sırası ile 17,3 ve 13,8 gün idi. Çalışma gruplarımızdaki erken tam enteral beslenmeye geçişinin yüksek AS içeriği ile ilgili olduğu düşünülmüştür.

Çalışmamızdaki hastaların tamamı AS ile beslenmişti ancak sadece AS ile beslenen bebek sayısı plasebo kontrol grubunda daha fazlaydı. Anne sütüne ek olarak mama almak zorunda kalan bebeklerin aldığı mama miktarları değerlendirildiğinde, plasebo kontrol grubundaki dokuz hastanın sadece birinin aldığı AS miktarı totalin % 55'iydi. Diğer sekiz hasta % 80 ve üzerinde AS ile beslenmişti. Oral LF profilaksi grubunda ise 12 hastanın altısında % 80 ve üzerinde AS kullanımı vardı. Plasebo kontrol grubunun AS ile beslenme oranları daha yüksekti ancak fark anlamlı değildi. Bu, oral LF grubundaki 18 hastanın çoğul gebelik ürünü iken, plasebo kontrol grubundaki sadece 9 hastanın böyle olmasına bağlandı.

Grupları değerlendirdiğimizde plasebo kontrol grubundaki intolerans göstergelerinin daha yüksek olduğu, ancak istatistiksel farkın sadece O/G drenajda geçirilen günde saptandığı görüldü. Plasebo kontrol grubunda O/G drenajda geçirilen gün sayısının daha fazla olması, bu grupta daha fazla hastada NEK görülmesi ile ilişkilidir. Tüm intolerans parametrelerinin oral LF profilaksi grubunda düşük olması, LF'nin çok iyi bir şekilde tolere edildiğini göstermektedir. Daha önce infantlarda ve ÇDDA'lı bebeklerde oral LF verilen iki çalışmada da herhangi bir intolerans bulgusu gösterilmemiştir (127,157).

Laktoferrin, kolostrumda daha yoğun olmakla birlikte AS'nün önemli bir bileşeni olarak bulunduğu için, gruplarımızı yattıkları süre içerisinde günlük aldıkları ortalama AS hacimleri açısından değerlendirdik. Oral LF profilaksi grubunun günlük aldığı AS hacmi, plasebo kontrol grubuna göre daha yüksek olarak bulundu. Ancak bu fark, plasebo kontrol grubundaki O/G serbest drenajda geçirilen ve beslenme intoleranslı gün sayısının daha fazla olmasına bağlandı.

Geç neonatal sepsis için önemli bir risk faktörü oluşturan santral kateter varlığı ve süresinin değerlendirildiği araştırmalardan Stoll ve ark.'nın yayınladığı verilerde, % 51 hastada umbilikal arter kateteri, % 40 hastada umbilikal ven kateteri kullanıldığı, kateter süresindeki artışın, GNS insidansındaki artış ile doğru orantılı bulunmuştur (1). İsveç verilerinde ise <1500 g bebeklerde umbilikal kateter kullanım oranı %30 iken, >1500 g bebeklerde bu oran %18'di (158). Bizim çalışmamızda ise 11 (%22) hastaya UAK, 14 (%28) hastaya UVK takılmıştı. Gruplara göre baktığımızda; plasebo kontrol grubunda UAK ve UVK takılan hasta sayıları 3 (%12) ve 6 (%24), oral LF profilaksi grubunda ise sırası ile 8 (%32) ve 8 (%32) idi. Kateter giriş bölgesini kolonize eden ya da sağlık personelinin ellerinden bulaşan koagülaz negatif stafilokok (KNS) ve diğer mikroorganizmalar kateter kaynaklı enfeksiyonların en sık sebepleridir. Kateter kaynaklı kan akımı enfeksiyonu, bakterilerin kateter lümeninin içinden ya da dışından ilerlemesi ile oluşabileceği gibi, gram (-) ve mantar gibi patojen intestinal floranın transloke olması ile de ortaya çıkabilir. Lümen içi kontaminasyon, kontamine IV sıvılarla ya da kontamine kateter kapakları ile oluşur (24,35,159). Bizim çalışmamızda kateter kullanım oranı ve kateter kolonizasyonu oral LF profilaksi grubunda daha fazlaydı. Ancak kolonize olan bu mikroorganizmaların hiç biri oral LF profilaksisi başladıktan sonra kateter kaynaklı sepsise neden olmamıştır, bu da oral LF profilaksisinin kateteri kolonize eden mikroorganizmanın sistemik yayılımını engellediğini düşündürmektedir.

Gestasyon haftası özellikle 32 haftadan küçük prematüre bebeklerin transplasental geçen IgG düzeyleri term bebeklere göre oldukça düşüktür. Bu nedenle prematüre bebeklere IV Ig vererek nozokomiyal enfeksiyonu önlemeye yönelik yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Cochrane metaanalizinde; profilaktik kullanımının mortalite, NEK, IVK ya da hastanede kalışı azaltmamakla birlikte, bir veya birden fazla enfeksiyon geçirmeyi % 4 azalttı

gösterilmiş, ancak şüpheli ya da ispatlanmış sepsiste tedavi amaçlı poliklonal IV Ig kullanımını destekleyecek yeterli veri bulunmadığı belirtilmiştir (160). Yenidoğanlarda IgM ile zenginleştirilmiş IV Ig ile yapılmış iki RCT’de sepsis mortalitesi üzerine olumlu etkisi gösterilememiştir (161,162). Ancak bu konuda yeterli sayıda çalışma yoktur. Ünitimizde kullanmakta olduğumuz IgM ile zenginleştirilmiş IV Ig preparatının çalışma gruplarının geçirdikleri sepsis atakları üzerine muhtemel etkileri düşünüldüğü için yaptığımız analizde, her iki grupta eşit sayıda hastada kullanıldığı için bizim çalışmamızda sonuçları etkileyen bir faktör değildir.

Yenidoğanlarda, nötropeni olsun ya da olmasın klinik ve kanıtlanmış sepsislerde tedavi amaçlı ya da sepsisi engellenmek için profilaktik olarak kullanılan G-CSF, sepsis ilişkili mortaliteyi etkilemediği, ancak sistemik enfeksiyonu olan nötropenik hastaya verilmesi durumunda mortaliteyi belirgin azalttığı gösterilmiştir (163). Ünitimizde klinik ve kanıtlanmış sepsiste, nötropeni eşlik ediyorsa uygulanan G-CSF’in her iki gruptaki G-CSF kullanılan hasta sayısı eşit olduğu için, iki grup arasındaki sepsis sayısındaki farka neden olmadığı öngörülmüştür.

Geç neonatal sepsis tüm dünyada özellikle ÇDDA bebekler için halen en önemli sorundur. Stoll ve ark’nın yayınladığı, 1998-2000 yılları arasına ABD’deki YDYBÜ’lerindeki ÇDDA bebeklerdeki GNS verileri ile ilgili makalede, >72 saat yaşayan 6215 bebeğin %21’inde en az bir kez kültür pozitif sepsis görüldüğü bildirilmektedir (1). Merkezler bireysel olarak değerlendirildiğinde GNS insidansı %10,6 ile % 31,7 arasında değişmekteydi. Almanya’dan yayınlanan 52 ünitenin 2000-2005 yılları arasındaki verilerini gösteren makalede, 8677 ÇDDA bebeğin 1844’ünde (% 21,2) en az bir sepsis atağı görülmüştür (164). Bizim çalışmamızda bu oran % 30 olarak bulunmuştur. Çalışmamızın amacı oral LF profilaksisinin GNS üzerine etkisini değerlendirmek olduğu için, oral LF profilaksi grubunda henüz oral LF profilaksisi almadan klinik ya da kanıtlanmış GNS geçiren 5 hasta değerlendirme dışı bırakılmıştır. Grup 1’de 8, Grup 2’de 4 hastada en az bir defa kanıtlanmış sepsis görülmüştür. Toplamda kanıtlanmış sepsis atağı sayısı Grup 1’de 14 iken, Grup 2’de dörttü ve gruplar arasında istatistiksel fark vardı. Gruplar arasındaki bu fark oral LF profilaksisinin GNS’yi engelleyici etkisini ortaya koymaktadır.

Stoll ve ark'nın çalışmasında hastaların %72'si tek GNS geçirmişken, % 20'si iki atak, % 6'sı üç, % 2'si ise dört veya daha fazla atak geçirmişti (1). Bizim çalışmamızda bu oranlara baktığımızda iki grupta toplam 12 (% 80) hasta tek atak geçirmişken, sadece plasebo kontrol grubundaki birer hasta iki, üç ve dört kanıtlanmış GNS geçirmişlerdi. Grup1'deki 3 hastada birden çok kanıtlanmış sepsis atağı saptanmışken, Grup 2'de hiçbir hastada görülmemiş olması oral LF profilaksisinin tekrarlayan nozokomiyal sepsis ataklarını engellediğini düşündürmektedir.

Geç neonatal sepsise neden olan enfeksiyon ajanlarının dağılımına baktığımızda yapılan tüm çalışmalarda gram (+) ajanların % 45-77 ile en sık enfeksiyon sebebi olduğu, bunu % 19-36 ile gram (-) ve 3. sırada kandidanın izlediği görülmüştür. ABD verilerinde gram (+) ajanlardan en sık KNS iken, 2. sırada S. Aureus, 3. sırada enterokok türleri saptanmıştır. Gram (-) bakteriler arasında Klebsiella türleri en sık, E. Coli ve Enterobakter türleri 2. ve 3. sırada, Pseudomonas ve Serratia ise bunları izlemekteydi (35). Almanya verilerinde ise 1. sırada yine KNS, 2. sırada S. aureus, 3. sırada ise Enterobakter, 4. ve 5. sıralarda ise Klebsiella ve E. coli yer almaktaydı (164). Mantar enfeksiyonu insidansı DA ile ters orantılıydı. İnvaziv mantar enfeksiyonu ile ilgili olarak Benjamin ve ark.'nın yaptığı çalışmada; 400-750 g doğan bebeklerde insidans %11,4 iken 751-1000 g doğanlarda %3,4 bulunmuştur (165). Bizim çalışmamızda da toplam 18 kültürde 8 (% 44,4) metisilin dirençli KNS, 4 (%22,2) ESBL+ E.Coli, 3 (%16,7) Candida, 1 (% 5,6) enterokok, 1 (%5,6) Klebsiella, 1 (%5,6) Pseudomonas aureginosa üremesi tespit edildi.

Stoll ve ark'nın yayınladığı ABD verilerinde, 6956 ÇDDA bebekten 1313'ü GNS olmuş ve bunların da 242'si kaybedilmişti (1). Bunlardan 101'i gram (+), 93'ü gram (-) sepsisten, 48'i ise mantar sepsisinden kaybedilmişti. Gram (-) organizmalara bağlı mortalite % 19-36 ile gram pozitiflere bağlı mortaliteden (% 6) daha yüksekti. Mantar enfeksiyonuna bağlı mortalite ise % 22 ile % 33 arasında değişmektedir (35). Bizim çalışmamızda sepsise bağlı mortalite kaydedilmedi.

Yenidoğanın nispeten olgunlaşmamış immün sistemi anne sütünün biyoaktif içeriği ile kompanse edilmektedir. Anne sütü, intestinal sistemin dış dünyaya fizyolojik, biyokimyasal ve anatomik adaptasyonuna, epiteli bakterilere daha az

geçirgen hale getirerek ve faydalı bakterilerin kolonizasyonu sağlayarak yardımcı olmaktadır. Anne sütü içerdiği immün hücreleri, LF, lizozim, oligosakkaritler, lipidler, sitokinler ve nükleotidlerle immün sistemin olgunlaşmasını uyarır. Bu “immün sistem düzenlenmesi” AS ve F ile beslenen bebeklerin lenfosit alt gruplarındaki farklılıkları ortaya koyan çalışmalarla da gösterilmiştir (166,167).

Laktoferrinin antimikrobiyal, immünmodulator ve anti-inflamatuvar etkilerini inceleyen çalışmalar olsa da, yenidoğanlarda özellikle de ÇDDA bebeklerde bu çalışma dışında tek bir çalışma yapılmıştır. İlk kez 2007 yılında King ve ark.'nın Hollanda'da 52, DA >2000 g olan geç preterm ve term bebekte çift-kör, plasebo kontrollü çalışmada, 26 bebeğe bir yıl süre ile 850mg/l bLF içeren mama desteği uygulanmış ve LF katkılı mama alan grupta daha az alt solunum yolu enfeksiyonu, özellikle hışıltı olduğu ve 9. ayda daha yüksek hematokrit düzeylerine ulaşıldığı gösterilmiştir (157). Bebeklerde yapılan bu ilk çalışmada özellikle LF'e bağlı herhangi bir intolerans, yan etki görülmemiş olması bundan sonra yapılan çalışmalar için yol gösterici olmuştur.

İtalya'da çok merkezli, randomize, çift kör, plasebo kontrollü, yapılan 2. çalışmada; 472 ÇDDA bebek üç gruba bölünerek, <1000 g bebeklere 6 hafta, 1000-1500 g arasına ise 4 hafta süreyle, tek başına 100mg/gün bLF (sığır kaynaklı LF), bLF ile birlikte 6×10^9 CFU Lactobacillus rhamnosus GG (LGG) ya da plasebo verilmiş, GNS'nin hem tek başına bLF alan hem de bLF+LGG alan grupta belirgin oranda azaldığı ve toplam mortalite üzerinde fark yaratmasa da sepsis ilişkili mortalitenin anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur (127).

Çalışmamızda insan LF'i ile aminoasit yapıları açısından % 77 benzerlik göstermesi, sindirimi sonrası elde edilen laktoferrisinle birlikte insan kaynaklı olanlara göre daha iyi antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gösterildiği için sığır kaynaklı, endüstriyel olarak üretilen LF tercih edilmiştir. Manzoni ve ark, bLF'nin günlük verilecek dozunu, ÇDDA bebeklerin yaşamlarının ilk iki haftasında alacakları LF miktarını 30-150 mg/gün olduğunu öngörerek 100 mg olarak belirlemişlerdi. Çalışmalarında bLF veya bLF+LGG'yi, postnatal 3. günde, ilk 72 saatte kaybedilmeyen ve erken neonatal sepsis olmayan bebeklere, doğum ağırlıklarına göre belirledikleri sürelerde vermişler ancak çalışma sonuçları değerlendirildiğinde bLF'nin GNS azaltıcı etkisini özellikle <1000 g bebeklerde belirgin olarak

saptadıkları için 100 mg/gün bLF'nin sadece 4 hafta verilmesinin >1000 g bebeklerde yetersiz olabileceğini öne sürmüşlerdir (127). Çalışmamızda, Manzoni ve ark.'nın önerdiği gibi, daha yüksek dozda (200 mg/gün) bLF kullanıldı. Beslenmeye bLF veya plasebo olarak kullandığımız SF'i eklemeye ise günlük enteral beslenme hacmi 20 ml/kg'a ulaştığında başlandı. Bu, bLF'nin henüz ÇDDA bebeklerde oral kullanımının beslenme intoleransına sebep olup olmadığı çalışmalarla net olarak bildirilmediği için, minimal enteral beslenme dönemindeki ortaya çıkabilecek rezidü, kusma, batın distansiyonu gibi bulguların LF'e bağdaştırılmaması için tercih edildi. İki gruptaki hastalara ortalama 2. günlerinde minimal enteral beslenme başlanmış olmasına rağmen, bLF ya da plasebo almaya ortalama 1. haftanın sonlarında başlandı. Bu nedenle de ortalama olarak 11. günde ilk GNS ataklarını, LF'den henüz koruyuculuğunu gösterebileceği kadar alamadan geçirmişlerdir. Oral LF profilaksi grubundaki hastalarımızı kanıtlanmış ilk GNS atakları açısından değerlendirirsek; bir hasta iki doz, ikisi 3 doz, bir tanesi ise 7 doz aldıktan sonra GNS olmuştu. Buna rağmen oral profilaksi olarak verdiğimiz LF, GNS ataklarını plaseboya göre istatistiksel olarak anlamlı olarak azaltmaktadır.

Geç neonatal sepsis atakları ÇDDA bebeklerde özellikle invaziv girişimlerin, MV desteğinin, TPN'nin kullanıldığı ilk haftalarda görülüyor olmasına rağmen, bebeklerin hastanede yattıkları süre içerisinde GNS geçirebilecekleri düşüncesi ile bLF desteğini tüm yatış süresince uyguladık. Oral LF profilaksi grubundaki bebekler ortalama 25 doz (5 g) bLF desteği aldılar. Bu miktar, term bebeklerin ilk bir hafta içinde annelerinden emerek aldıkları günlük 3g (21 g/hf) LF'inden oldukça düşük ancak Manzoni ve ark verdikleri en fazla 4,2 g'dan yüksektir.

Manzoni ve ark, bLF'nin tek başına verildiği grupta evre 2 ve üzerindeki NEK'leri azalttığını ancak bunun bLF+LGG grubundaki gibi istatistiksel olarak anlamlı olmadığını belirtmişlerdir (127). Bizim çalışmamızda da oral LF profilaksi grubunda hiç ciddi NEK görülmemesine rağmen, plasebo kontrol grubunda beş hastada evre 2 ve üzeri NEK görülmüştür, ancak bu fark istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır.

Manzoni ve ark, tek başına AS almanın bLF suplementasyonu ile görülen faydayı göstermediğini belirtmişlerdir (127). Biz de hastalarımızı, doğal olarak LF içeren AS almalarına göre değerlendirdiğimizde, iki grubumuzda da sadece AS ile

beslenme oranlarımız Manzoni ve ark'nın çalışmasına göre daha yüksekti. Hiçbir hastamız sadece mama ile beslenmemiştir. İstatistiksel fark saptanmamış olsa da karışık beslenen (AS+F) hasta sayısı oral LF profilaksi grubunda daha fazla ve bu hastalarda AS oranı daha düşüktü. Çalışmamızda, AS'nü bLF ile desteklediğimiz grupta daha az GNS görülmüş olması, bize de Manzoni ve ark gibi, bLF+AS'nün ağırlıklı olarak AS ile beslenmeden daha iyi olduğunu düşündürmektedir.

Sherman ve ark'nın 2004 yılında yayınladıkları çalışmada, neonatal ratlara E.coli verilmeden önce LF ve Lactobacillus GG verilmiş. İkisinin birlikte verilmesinin, distal ince bağırsaktaki lenfatik dokunun olgunlaşmasını uyardığı, barsak duvarından elde edilen homojenatlarda daha az E.coli bulunmasına ve histolojik preparatlarda distal ileumdaki enterositlerde daha az ödem ve balonlaşmaya neden olduğu gösterilmiştir (168).

Laktoferrinin dolaşımında ve dalakta bulunan B lenfositlerle etkileşimi olabildiği bilinmektedir (169,170). Barsak mukozasında B lenfositler kadar T lenfositler de bulunmaktadır ve bunlar 'initiator' ve 'effector' diye iki grupta incelenir (169,171). Birinci grup Peyer plaklarını ve mezenterik lenf nodlarını içeren gut ilişkili lenfoid dokunun (GALT) ilkel hücrelerinden oluşmaktadır. İkinci grup ise lamina propriadaki ve epiteller arasındaki antijen deneyimi olan T hücrelerini içermektedir. Bu grup, GALT'daki lenfositlerin uyarılması sonrasında epitele giren ve lümendeki patojenlere karşı organizmayı ilk basamakta hızlı, etkin ve uzun süreli olarak koruma sağlayan hücrelerdir (171). Actor ve ark, LF'in her tür T hücresine bağlanabildiğini, hücrenin maturasyon, farklılaşma ve/veya aktivasyon durumuna göre anti-inflamatuar ya da stimülasyon yönünde etki yapabileceğini belirtmektedirler (172).

Nielsen ve ark'nın yavru domuzlardan elde edilen ince bağırsak doku örneklerinde LF ile yaptıkları çalışmada, oral alımı sonrasında ince barsak mukoza hücrelerinden hangilerinin LF'nin hedef hücreleri olduğunu saptaması amaçlanmıştır (169). Bu çalışmada; immunmikroskopi ile ortamdaki LF'nin büyük bir kısmının inkübasyonun 30. dakikasında luminal fırçası yüzeye yapıştığı, sonra apikal endositoz ile hücre içine alındığı görülmüştür. İkinci saatin sonunda tüm LF'in hücre içinde noktasal tarzda bulunması ve endositozu engelleyen +4°C'da 1 saatlik inkübasyon sonrasında hücre içinde hiç LF görülememesi, LF'in enterositler içine

apikal endositoz ile alındığını kanıtlamıştır. Laktoferrinin enterosit içine alınması ile ilgili iki farklı mekanizma olabileceği ileri sürülmüştür; enterosit yüzeyindeki intellektin denilen LF reseptörleri aracılığı ile olabileceği gibi, LF'in yapısında sahip olduğu katyonik yüzeyleri ile fırçamsı yüzeyin negatif yüklü kısımları ile direkt bağlanmış olabilir. Bunun dışında lamina propriadaki bir grup hücrenin daha enterositlerin noktasal boyanma tarzından farklı olarak sitoplazmalarında diffüz şekilde LF ile boyandığı görülmüş ve bu hücrelerin ağırlıklı olarak CD3⁺ T lenfositler olduğu, az sayıda da CD8⁺ sitotoksik T lenfositlerin de boyandığı saptanmış. Bu çalışmada, T lenfositlerin LF'nin hedefinde olduğu gösterilmiş olmakla birlikte, bu hücrelerin ne yönde uyarıldığı gösterilmemiştir.

Geniş gastrointestinal yüzey organizmanın yabancı antijenlerle karşılaştığı en önemli bölgedir. Bu yabancı antijenlerin hiçbirisi normal şartlarda inflamasyona sebep olmamaktadır. Bu da bağırsaklarda uygunsuz immün yanıtı engelleyen bir sistem olduğunu göstermektedir. Bağırsaklardaki bu dengede FOXP3⁺ hücrelerin rolü çok önemlidir. İçerdiği lenfoid doku ile bağırsakların FOXP3⁺ Treg hücrelerinin ilkel öncüllerinden oluşumunun uyarılması için önemli bir bölge olduğu ile ilgili çalışmalar da bulunmaktadır (86). Antijen sunumu için gerekli olan dendritik hücrelerin, bağırsaklar için özelleşmiş olan tiplerinin CD103 eksprese ederek Treg gelişimini etkilediği, CD103⁺ dendritik hücrelerin TGF- β ve retinoik asit aracılığı ile FOXP3⁺ Treg hücrelerini uyardığı gösterilmiştir (86). Ayrıca probiyotiklerden, *Lactobacillus reuteri* ve *casei* ile uyarılan dendritik hücrelerin Treg oluşumunu uyardığı, uyarılan Treg'lerin IL-10 üretimini artırma ya da FOXP3 ekspresyonu ile efektör T hücrelerini baskıladığı gösterilmiştir (173).

Sepsiste; belirgin inflamasyonla erken ölüm, pro ve anti-inflamatuarlar arasındaki hassas denge ile ilerleyen iyileşme veya üst üste gelen başka enfeksiyonlara sebep olan abartılı bir anti-inflamasyon süreci ile açıklanmaktadır. Bu sonuncu ihtimal, lenfositlerin anejisi, apoptozu ve antijen sunma kapasitesinde azalma ile karakterli, "immunparaliz" olarak adlandırılmaktadır (174). Anti-inflamatuar IL-10, TGF- β gibi sitokinlerin aşırı üretimi ve doğal reglatur T hücreleri gibi bu durumu açıklayacak çok çeşitli mekanizma ileri sürülmüştür. İmmün sistemde T hücrelerinin çok az bir kısmını oluşturmalarına rağmen CD4⁺CD25⁺ T hücreleri, güçlü reglatur özellikleri nedeniyle, sepsis sırasındaki

immün yanıtın baskılanmasında çok önemlidir. Sepsis ve septik şokta regülatuar T hücrelerinin rolü ile ilgili yapılan az sayıda çalışmada farklı sonuçlar elde edilmiştir (174,175). Monneret ve ark., septik şoktaki hastaların kan örneklerinde daha yüksek oranda Treg hücrelerini göstererek, insanlardaki sepsiste Treg hücrelerinin rolünü ilk kez ortaya koymuşlardır. Sağlıklı kontrollerle karşılaştırdığında, septik şokun başlamasından itibaren CD4+CD25+ T hücrelerinin kademeli olarak belirgin şekilde arttığını göstermişlerdir. Sepsisin 7-10. günlerinde, CD4+CD25+ T hücre düzeylerinin sepsisten kaybedilen grupta, sepsisten kurtulanlara göre daha yüksek düzeylerde (sırası ile 38 ± 5 ve 24 ± 3) olduğu bulunmuş ve yazarlar uzamış CD4+CD25+ T hücre varlığının ciddi immunparalize sebep olduğu ve bunun kötü prognoz ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (175). Ancak aynı grup bu ilk çalışmadan yaklaşık bir yıl sonra bu sonuçlarının CD4+ T hücre grubu içerisinde CD25+ hücre oranının artışı Treg hücrelerinin artışı ile değil CD25- hücrelerin selektif olarak azalmasına bağlı olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda, septik şok süresince başlangıçtaki hafif yükselme dışında Treg hücrelerinin normal sınırlarda kaldığını göstermişlerdir (176). Ancak her iki çalışmada bakılan CD4+CD25+ hücrelerdir ve bunlar son yıllarda kabul edilen, bizim de çalışmamızda değerlendirdiğimiz CD4+CD25^{high} lenfositlerdeki FOXP3 ekspresyonu ile gösterilen gerçek Treg hücreler değildir.

Heuer ve ark.'nın, farelerde septik şok modelinde yaptıkları çalışmada, aktif Treg'lerin dışarıdan transferinin sepsis mortalitesini azalttığı ortaya konmuştur. Çoklu mikroorganizmaya bağlı sepsisten hemen önce ya da altı saat sonra yapılan bu transferin, doz bağımlı olarak bakteri sayısını ve mortaliteyi azalttığı ve TNF- α üretimini arttırdığı gösterilmiştir (177).

Hein ve ark.'nın yaptıkları çalışmada ise; sepsisin 1. gününde hasta gruptaki Treg'lerin yüzdesi ve tam sayısı, sağlıklı gönüllülerden daha düşük olarak bulunmuştu (174). Sepsisin 3. ve 7. gününde ise hasta bireylerin hücre sayısında ve yüzdesinde artış olmasına rağmen halen sayısal olarak sağlıklı bireylere göre düşük kalmaya devam ettiği görüldü. Septik şok hastaları, kaybedilen ve yaşayan hastalar olarak ayrıldığında, sağ kalanların Treg düzeylerinin ölen hastalara göre tüm çalışma süreci boyunca daha yüksek olduğu görüldü. Aynı çalışmada septik şoktaki hastaların klinik ciddiyetinin Treg oranları ile ters orantılı olduğu bulundu.

Literatürdeki Treg, sepsis ilişkisini araştıran, erişkin hastalarda, az vaka ile yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalar tanımlayıcı değildir.

Çalışmamızda iki grubun başlangıç ve taburculuk sonrasındaki FOXP3 değerleri arasında anlamlı fark bulunmadı. Ancak iki grubu kendi içerisinde değerlendirdiğimizde başlangıç değerlerine göre her iki grupta da zaman içerisinde artış meydana geldiği, bu artışın oral LF profilaksi grubundaki hastalarda daha fazla olduğu görüldü. Her iki grupta görülen artışın zaman içerisinde gestasyonel yaş artışı ile ilişkili olabileceği düşünülse de, oral LF profilaksi grubundaki daha az sepsis ile birlikte daha fazla artış gösteren FOXP3 ekspresyon değerlerinin “Heuer ve Hein’in çalışmalarındaki gibi yüksek Treg düzeylerinin sepsise olumlu etkisi”ne paralel bir sonuç olabileceği düşünülmüştür. Diğer yandan, FOXP3 düzeylerini, taburculuk sonrasında yani herhangi bir enfeksiyon olmaksızın baktığımız için sepsis çalışmalarındaki sonuçlarla kıyaslanması doğru bir yaklaşım değildir.

Normal gebelik sürecinde regülatuar T lenfositlerin sayısının artarak fetal antijenlere karşı annenin immüntoleransını artırdığı, tersine azalmış Treg hücre düzeylerinin fetusun immünolojik rejeksiyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (178). Benzer şekilde preeklamsideki abartılmış sistemik inflamasyonun regülatuar T hücre azlığı ile ilgili olabileceği ileri sürülmüştür. Bu konu ile ilgili yapılan çeşitli çalışmalarda normal gebelerdeki Treg hücre düzeylerini ve FOXP3 ekspresyonunu preeklantik gebelerde daha düşük bulunmuştur (179). Bizim çalışma gruplarımızdaki bebeklerin ilk Treg düzeylerini, annelerindeki preeklamsi durumuna göre değerlendirdiğimiz alt analizde; preeklantik anne bebekleri her iki çalışma grubundan dışlandıktan sonra da ilk FOXP3 ekspresyonları arasında istatistiksel fark gözlenmemiş olması preeklamsinin bizim sonuçlarımız üzerine etkisi olmadığını düşündürmüştür.

Doğum şeklinin T regülatuar hücre düzeyleri üzerine etkisi 2008 yılında AÜTF Allerji ve İmmunoloji Bilim Dalı’nda yapılan bir tez çalışmasında gösterilmiştir (180). Bu çalışmada term gebelik sonrasında NSVY ve elektif CS ile doğum yapan kadınlardan ve bebeklerinden alınan kordon kanında Treg hücre düzeyleri bakılmış ve NSVY ile doğum yapan kadınların ve bebeklerinin Treg hücre düzeyleri, elektif CS grubundakilere göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak bizim

hastalarımızın tamamına yakını her iki grupta CS ile doğduğu için bu sonuçlarımızı etkileyecek bir faktör olarak kabul edilmemiştir.

Bu çalışmada, benzer demografik özelliklere sahip ÇDDA bebeklerden 200 mg/gün bLF verilen grupta, plasebo grubuna göre daha az sepsis ve cerrahi NEK olgusu saptanmıştır. Daha önce Manzoni ve ark yapmış olduğu çalışmadan farklı olarak, bu etkinin hangi immünolojik mekanizma üzerinden olduğunu aydınlatabilmek için iki gruptaki hastalardan doğumda ve taburculuk sonrası Treg hücrelerinin aktivitesini gösteren FOXP3 ekspresyonu değerlendirilmiştir. Oral olarak LF profilaksisi verdiğimiz gruptaki FOXP3 ekspresyonundaki artışın daha fazla olduğunun saptanması benzer gruplar arasında, benzer postnatal zamanlarda bakılan bu değerdeki farkın, vermiş olduğumuz LF ile ilişkili olabileceği, LF'nin GNS ve NEK'i engelleyici etkisini, immün sistem üzerinde regülatuar fonksiyonlarının tamamı henüz aydınlatılamamış Treg hücreleri aracılığı ile yaptığı düşünülmüştür.

Çalışma süresince herhangi bir yan etkisi görülmeyen, intoleransa sebep olmayan, kolostrumun doğal bir bileşeni olan LF'nin profilaktik olarak kullanımı, ÇDDA bebeklerde GNS ve NEK açısından ümit vaat edicidir. Ancak en etkin doz, zamanlama, kullanılma süresi ve etki mekanizmaları ile ilgili daha fazla sayıda çalışma gerekmektedir.

6. SONUÇLAR

Çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerde sepsis ve NEK için engelleyici bakım standardının anne sütü ile beslenme olduğu bilinmektedir. ÇDDA prematüre bebeklerde sepsis ve NEK'in mortalitesi ile kısa ve uzun dönem morbiditesi ve maliyetin neden olduğu global yük dikkate alındığında, düşük maliyetli, basit, uygulaması kolay engelleyici girişimlerin yararının araştırılması önem taşımaktadır.

Bu prospektif, randomize, plasebo kontrollü klinik çalışma ile; ÇDDA bebeklerde, kolostrumda yüksek konsantrasyonda bulunan laktoferrin ile yapısal benzerliği olan sığır laktoferrininin, oral proflaksisinin sepsis ve NEK'in engellenmesindeki etkinliği ve mekanizmasının araştırılması planlanmıştır.

Bu amaçla benzer demografik özelliklere sahip ÇDDA bebeklerde yaptığımız çalışmada 200 mg/gün LF veya plasebo hastanede yatış süresince verilmiştir. Hastalar klinik bulguları açısından değerlendirilmeye ek olarak CD4+CD25+ FOXP3 ekspresyonları akım sitometrisi ile doğumda ve taburculuk sonrasında bakılmıştır.

Çalışmanın sonuçları şu şekilde özetlenebilir:

1. Oral LF profilaksi grubunun beslenme intoleransını değerlendirmek amaçlı kullandığımız kusma, rezidü ya da O/G drenajda geçirilen gün sayıları plasebo kontrol grubuna göre daha düşüktü ve tamamen enteral beslenmeye geçiş zamanı daha erken gerçekleşmişti. Bu bulgularla ve çalışma süresince herhangi bir yan etkisi görülmemesi nedeniyle sığır laktoferrininin ÇDDA bebeklerde oral kullanımının güvenli olduğu gösterilmiştir.
2. Kanıtlanmış nozokomiyal sepsis oral LF profilaksi grubunda, profilaksi başlandıktan sonra 20 bebeğin 4'ünde, plasebo kontrol grubunda ise 25 bebeğin 8'inde görülmüştür. Plasebo kontrol grubunda birer hastada 2, 3 ve 4 sepsis atağı ile toplam 14 sepsis atağı görülmesi, LF proflaksi grubunda hiçbir hastada 2. sepsis atağının olmaması ve toplamda sadece 4 sepsis atağının görülmesi, istatistiksel olarak anlamlı olarak oral LF proflaksisinin, GNS ataklarının ve tekrarlayan nozokomiyal sepsis ataklarının engellenmesinde yararlı olduğunu göstermiştir.
3. Oral LF profilaksi grubundaki hiçbir hastada Evre 2 ve üzerinde NEK gelişmezken, plasebo kontrol grubundaki 5 hastada gelişmiştir. Gruplar

arasında istatistiksel fark gösterilememiştir ancak Evre 2 ve üzerinde NEK geçiren hasta sayısındaki azalma ümit vaat etmektedir.

4. Oral olarak LF profilaksisi verdiğimiz gruptaki FOXP3 ekspresyonundaki istatistiksel olarak anlamlı artış LF profilaksisinin GNS ve NEK'i engelleyici etkisinin, immün sistem üzerinde regülatuar fonksiyonlarının tamamı henüz aydınlatılamamış Treg hücreleri aracılığı ile olabileceğini düşündürmüştür.

Öneriler;

1. Bu çalışmada nozokomiyal sepsis oranı; nozokomiyal enfeksiyon riskini azaltan faktörlerden, el yıkama ve el antisepsisine dikkat edilmesine, girişimlerin steril uygulanmasına, izolasyon koşullarının sağlanmasına, invaziv ventilasyon uygulanan hasta sayısının az ve süresinin kısa olmasına, katater kullanım oranının düşük ve süresinin kısa olmasına, erken anne sütü ile beslenmenin başlanması ve anne sütü ağırlıklı devam edilmesine, invaziv olmayan monitorizasyon yöntemlerinin kullanılmasına rağmen literatürle karşılaştırıldığında yüksek bulunmuştur. En sık üreyen mikroorganizmaların MRKNS, ESBL+ E. Coli ve G(-)'lerin çoklu direnç gösteren suşlar olduğu tespit edilmiştir.
2. Olguların % 80'ine doğar doğmaz antibiyotik başlanması ve ortalama 5,5-6 gün kullanılması, kateter kaynaklı enfeksiyon oranının yüksek olması, TPN kullanımı ve süresi, geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı, sepsis oranlarını artıran faktörler olarak görülmüştür. Sepsis gelişimine risk yarattığı bilinen faktörlerden hasta bakım koşulları, hemşire başına düşen hasta sayısı, enfeksiyonu engelleyici uygulamalara uyum gibi parametreler bu çalışmada ölçülmemiştir.
3. Sepsisi engellemek, tedavi etmeye çalışmaktan daha önemlidir. ÇDDA bebeklerde nozokomiyal sepsisin; bakım ekibinden bağımsız, bebeğin yetersiz bağışıklık sistemi ve mutlak gereklilikteki kateter, ventilasyon, TPN gibi invaziv girişimlere bağlı olarak engellenemez bir durum olduğunu ve bakım ekibinin en önemli odağının enfeksiyon semptomlarını erken tanıyıp erken tedavi başlamak olduğunu düşünmek yanlıştır. Doğru yaklaşım ise; yetersiz immün sistemi ve mevcut risklerin çok iyi bilinerek, bu riskleri

azaltmaya yönelik bakım koşulları geliştirilmesi ve ÇDDA bebeklere bakım ve tedavi sunan ekiplerin nozokomiyal sepsisin engellenebilir olduğuna inanmasıdır.

4. Çalışma süresince herhangi bir yan etkisi görülmeyen, intoleransa sebep olmayan, kolostrumun doğal bir bileşeni olan LF'nin profilaktik olarak kullanımı, ÇDDA bebeklerde GNS ve NEK'i engelleyici bir yaklaşım olarak ümit vaat edicidir. Ancak en etkin doz, zamanlama, kullanım süresi ve etki mekanizmaları ile ilgili daha fazla sayıda çalışma gerekmektedir.

ÖZET

YENİDOĞAN YOĞUN BAKIM ÜNİTESİNDE YATAN ÇOK DÜŞÜK DOĞUM AĞIRLIKLIL BEBEKLERİN SEPSİS VE NEK GELİŞİMİNİ ENGELLEMeye YÖNELİK ORAL LAKTOFERRİN PROFİLAKSİSİ VE T-REGULATUAR HÜCRELER ÜZERİNE ETKİSİ

Çok düşük doğum ağırlıklı (ÇDDA) bebeklerde, nozokomiyal sepsis ve nekrotizan enterokolit (NEK), önemli mortalite ve morbidite nedenleridir. Çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerde sepsis ve NEK için engelleyici bakım standardının anne sütü ile beslenme olduğu ortaya konmuştur. Bu amaçla kolostrumda yüksek konsantrasyonda bulunan laktoferrinin oral profilaksisinin sepsis ve NEK'in engellenmesindeki etkinliği ve mekanizmasının araştırılması planlanmıştır.

Bu çalışma prospektif, randomize, plasebo kontrollü olarak ÇDDA bebeklerde yapılmıştır. Hastalar iki gruba ayrıldıktan sonra Grup 1'e (n=25) plasebo, Grup 2'ye (n=25) 200 mg/gün LF, beslenme hacimleri 20 ml/kg'a ulaştığında başlanmış ve hastanede yatış süresince verilmiştir. Hastaların demografik özellikleri, beslenme parametreleri, klinik sonuçları değerlendirilmiştir. Hastalardan doğumda ve taburculuk sonrasında alınan kan örneklerinden CD4+CD25+ FOXP3 ekspresyonu akım sitometrisi ile ölçülmüştür.

Gruplar; prenatal, natal ve postnatal özellikleri açısından benzerdi. Grup 1 ve 2'de ortalama gestasyon haftaları sırası ile $30,3 \pm 2,5$ ve $29,5 \pm 1,6$ hafta, doğum ağırlıkları ise sırası ile $1307 \pm 262,1$ ve $1290 \pm 346,7$ g idi. Grup 1 ve 2'de kanıtlanmış sepsis atağı sayısı sırası ile 14 ve 4 idi ($p < 0,05$). Grup 2'de hiç evre 2 ve üzerinde NEK görülmezken Grup 1'de 5 hasta vardı ($p > 0,05$). Gruplar arasında doğumda ve taburculukta bakılan FOXP3 ekspresyonları arasında fark saptanmamıştır. Ancak oral LF profilaksi grubundaki FOXP3 ekspresyonundaki artış daha fazla bulunmuştur ($p < 0,05$).

Oral LF profilaksisi GNS'i belirgin olarak, NEK'i ise istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte azaltmıştır. Oral LF profilaksisi verilen bebeklerde herhangi bir yan etki görülmemiş ve daha erken tam enteral beslenmeye geçilmiştir. FOXP3 ekspresyonundaki belirgin artışın, LF'nin GNS ve NEK'ten koruyucu etkisindeki mekanizma olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Çok düşük doğum ağırlığı, prematüre, yenidoğan, geç neonatal sepsis, nekrotizan enterokolit, laktoferrin, regumatuar T lenfosit

SUMMARY

ORAL LACTOFERRIN PROPHYLAXIS TO PREVENT SEPSIS AND NECROTISING ENTEROCOLITIS OF VERY LOW BIRTH WEIGHT NEONATES IN NEONATAL INTENSIVE CARE UNIT AND EFFECT ON T-REGULATORY CELLS

Nosocomial sepsis and necrotising enterocolitis (NEC) are important causes of neonatal mortality and morbidities of very low birth weight (VLBW) infants. Breast milk is accepted as a preventative measure for both sepsis and NEC in VLBW. Aim of the study is to evaluate whether oral administration of lactoferrin (LF), a normal component of human colostrum and milk, can enhance host defense and reduce late onset sepsis and NEC in VLBW infants, and to determine its effect on regulatory T cells.

The study was designed as a prospective, placebo-controlled, randomized trial in VLBW infants, who were randomly assigned to receive orally either 200 mg LF (n=25) or placebo (n=25) daily, when their feeding volume reached 20 ml/kg/day until discharge. Demographic parameters and clinical findings of the patients were evaluated. Episodes of suspected and culture proven late onset sepsis and NEC were recorded. CD4+25+ FOXP3+ lymphocytes were determined by flow cytometry at birth and discharge.

Prenatal, natal and postnatal characteristics of the groups were similar. Mean gestational ages of Group 1 and 2, were $30,3 \pm 2,5$ and $29,5 \pm 1,6$ weeks, and birth weights were $1307 \pm 262,1$ g and $1290 \pm 346,7$ g, respectively. During hospitalization period 14 vs 4 culture proven sepsis were observed in control and study group, respectively ($p < 0,05$). In group 2, none of the patients had grade 2 and 3 NEC, while 5 babies from Group 1 experienced grade 2 and 3 NEC ($p > 0,05$). Regulatory T cell levels at birth and at discharge were similar in two groups. The increase in FOXP3 expression at discharge was significantly higher in oral LF prophylaxis group ($p < 0,05$).

In this study, oral LF prophylaxis significantly lowered culture proven sepsis rate. Similar effect was observed in NEC rate but without statistical significance. The treated group took shorter time to reach full enteral feedings and no adverse effect

was observed. The significant higher increase in FOXP3 expression in the LF group can be the mechanism for protective effects of LF on late onset sepsis and NEC.

Key words: very low birth weight, premature, neonate, late-onset neonatal sepsis, necrotising enterocolitis, lactoferrin, regulatory T cells

KAYNAKLAR

- 1- Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Lemons JA, Donovan EF, Stark AR, Tyson JE, Oh W, Bauer CR, Korones SB, Shankaran S, Laptook AR, Stevenson DK, Papile LA, Poole WK. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*. 2002;110: 285-291.
- 2- Makhoul IR, Sujov P, Smolkin T, Lusky A, Reichman B; Israel Neonatal Network. Pathogen-specific early mortality in very low birth weight infants with late-onset sepsis: a national survey. *Clin Infect Dis*. 2005; 15;40(2):218-224.
- 3- Neu J, Walker WA. Necrotizing enterocolitis. *N Engl J Med*. 2011; 20; 364(3):255-264.
- 4- Wynn JL, Neu J, Moldawer LL, Levy O. Potential of immunomodulatory agents for prevention and treatment of neonatal sepsis. *J Perinatol*. 2009;29(2):79-88.
- 5- Edmond K, Zaidi A. New approaches to preventing, diagnosing, and treating neonatal sepsis. *PLoS Med*. 2010; 9;7(3):e1000213.
- 6- Hanson LA. Session 1: Feeding and infant development breast-feeding and immune function. *Proc Nutr Soc*. 2007;66(3):384-396.
- 7- Kessel A, Bamberger E, Masalha M, Toubi E. The role of T regulatory cells in human sepsis. *J Autoimmun*. 2009;32(3-4):211-215.
- 8- Lawn JE, Cousens S, Zupan J; Lancet Neonatal Survival Steering Team. 4 million neonatal deaths: when? Where? Why? *Lancet*. 2005;5-11; 365(9462):891-900.
- 9- Zaidi AK, Huskins WC, Thaver D, Bhutta ZA, Abbas Z, Goldmann DA. Hospital-acquired neonatal infections in developing countries. *Lancet*. 2005; 365(9465):1175-1188.
- 10- Stoll BJ, Hansen NI, Higgins RD, Fanaroff AA, Duara S, Goldberg R, Laptook A, Walsh M, Oh W, Hale E; National Institute of Child Health and Human Development. Very low birth weight preterm infants with early onset neonatal sepsis: the predominance of gram-negative infections continues in

the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, 2002-2003. *Pediatr Infect Dis J.* 2005;24(7):635-639.

11- Smith PB, Cohen-Wolkowicz M, Benjamin DK, Cotten CM, Clark RH, Benjamin Jr DK. Late onset sepsis in the neonatal intensive care unit. Society for Pediatric Research, Honolulu, HI: 2008.

12- Enrione MA, Powell KR. Sepsis, septic shock and systemic inflammatory response syndrome. In: Behrman RE, Kliegman RB, Jenson HB, eds. *Nelson Textbook of Pediatrics*. Philadelphia: Saunders, Elsevier Science, 2008: 1094-1099.

13- Stoll BJ. Infections in the neonatal infant. In: Behrman RE, Kliegman RB, Jenson HB, eds. *Nelson Textbook of Pediatrics*. Philadelphia: Saunders, Elsevier Science, 2008: 794-811.

14- Ovalı F. Yenidoğan sepsisi. In: Ovalı F eds. *Yenidoğan Enfeksiyonları*. İstanbul Medikal Yayıncılık, 2006: 109-154.

15- Fanaroff AA, Korones SB, Wright LL, Verter J, Poland RL, Bauer CR, Tyson JE, Philips JB 3rd, Edwards W, Lucey JF, Catz CS, Shankaran S, Oh W. Incidence, presenting features, risk factors and significance of late onset septicemia in very low birth weight infants. The National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *Pediatr Infect Dis J.* 1998 Jul;17(7):593-598.

16- Benitz WE, Gould JB, Druzin ML. Risk factors for early-onset group B streptococcal sepsis: estimation of odds ratios by critical literature review. *Pediatrics.* 1999 Jun;103(6):e77.

17- Stoll BJ, Hansen N. Infections in VLBW infants: studies from the NICHD Neonatal Research Network. *Semin Perinatol.* 2003 Aug;27(4):293-301.

18- Bang AT, Bang RA, Reddy MH, Baitule SB, Deshmukh MD, Paul VK, de C Marshal TF. Simple clinical criteria to identify sepsis or pneumonia in neonates in the community needing treatment or referral. *Pediatr Infect Dis J.* 2005 Apr;24(4):335-341.

19- Ng PC. Diagnostic markers of infection in neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2004 May;89(3):F229-235.

- 20- Pizzini C, Mussap M, Plebani M, Fanos V. C-reactive protein and serum amyloid A protein in neonatal infections. *Scand J Infect Dis.* 2000; 32(3):229-235.
- 21- Pierrakos C, Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care.* 2010; 14(1): R15.
- 22- Küster H, Weiss M, Willeitner AE, Detlefsen S, Jeremias I, Zbojan J, Geiger R, Lipowsky G, Simbruner G. Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 for early diagnosis of neonatal sepsis 2 days before clinical manifestation. *Lancet.* 1998;17;352(9136):1271-1277.
- 23- Fanaroff AA, Korones SB, Wright LL, Wright EC, Poland RL, Bauer CB, Tyson JE, Philips JB 3rd, Edwards W, Lucey JF, et al. A controlled trial of intravenous immune globulin to reduce nosocomial infections in very-low-birth-weight infants. National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *N Engl J Med.* 1994; 21;330(16):1107-13.
- 24- Edwards WH. Preventing nosocomial bloodstream infection in very low birth weight infants. *Semin Neonatol.* 2002;7(4):325-33.
- 25- Kramer MS. Balanced protein/energy supplementation in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000;(2):CD000032.
- 26- Haider BA, Bhutta ZA. Multiple-micronutrient supplementation for women during pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006; 18;(4):CD004905.
- 27- Sinha A, Lieu TA, Paoletti LC, Weinstein MC, Platt R. The projected health benefits of maternal group B streptococcal vaccination in the era of chemoprophylaxis. *Vaccine.* 2005; 2;23(24):3187-3195.
- 28- Harris AD, Samore MH, Nafziger R, DiRosario K, Roghmann MC, Carmeli Y. A survey on handwashing practices and opinions of healthcare workers. *J Hosp Infect.* 2000;45(4):318-321.
- 29- Muto CA, Sistrom MG, Farr BM. Hand hygiene rates unaffected by installation of dispensers of a rapidly acting hand antiseptic. *Am J Infect Control.* 2000; 28(3): 273-276.

- 30-** Maury E, Alzieu M, Baudel JL, Haram N, Barbut F, Guidet B, Bischoff WE, Reynolds TM, Sessler CN, Edmond MB, Wenzel RP. Alcohol-based handwashing agent improves hand washing. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2000;21(9):617-618.
- 31-** Vergnano S, Sharland M, Kazembe P, Mwansambo C, Heath PT. Neonatal sepsis: an international perspective. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2005;90(3): F220-224.
- 32-** Mullany LC, Darmstadt GL, Khatry SK, Katz J, LeClerq SC, Shrestha S, Adhikari R, Tielsch JM. Topical applications of chlorhexidine to the umbilical cord for prevention of omphalitis and neonatal mortality in southern Nepal: a community-based, cluster-randomised trial. *Lancet.* 2006; 367(9514): 910-918.
- 33-** Edwards WH, Conner JM, Soll RF; Vermont Oxford Network Neonatal Skin Care Study Group. The effect of prophylactic ointment therapy on nosocomial sepsis rates and skin integrity in infants with birth weights of 501 to 1000 g. *Pediatrics.* 2004;113(5): 1195-1203.
- 34-** Maas A, Flament P, Pardou A, Deplano A, Dramaix M, Struelens MJ. Central venous catheter-related bacteraemia in critically ill neonates: risk factors and impact of a prevention programme. *J Hosp Infect.* 1998; 40(3):211-24.
- 35-** Downey LC, Smith PB, Benjamin DK Jr. Risk factors and prevention of late-onset sepsis in premature infants. *Early Hum Dev.* 2010; 86 Suppl 1: 7-12.
- 36-** Chirico G. Development of the immune system in neonates. *J Arab Neonatal Forum.* 2005; 2:5-11.
- 37-** Rønnestad A, Abrahamsen TG, Medbø S, Reigstad H, Lossius K, Kaaresen PI, Engelund IE, Irgens LM, Markestad T. Septicemia in the first week of life in a Norwegian national cohort of extremely premature infants. *Pediatrics.* 2005;115(3): e262-268.
- 38-** Kafetzis DA, Skevaki C, Costalos C. Neonatal necrotizing enterocolitis: an overview. *Curr Opin Infect Dis.* 2003;16(4):349-355.

- 39- Quasier K. A specially severe form of enteritis in newborn, enterocolitis ulcerosa necroticans. II. Clinical studies. *Osterr Z Kinderheilkd Kinderfuersorge*. 1952; 20; 8(2):136-152.
- 40- 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.
- 41- Walsh MC, Kliegman RM. Necrotizing enterocolitis: treatment based on staging criteria. *Pediatr Clin North Am*. 1986; 33(1):179-201.
- 42- Updegrave K. Necrotizing enterocolitis: the evidence for use of human milk in prevention and treatment. *J Hum Lact* 2004; 20:335-339.
- 43- Lin PW, Stoll BJ. Necrotising enterocolitis. *Lancet* 2006; 368: 1271-1283.
- 44- Holman RC, Stoll BJ, Curns AT, Yorita KL, Steiner CA, Schonberger LB. Necrotising enterocolitis hospitalisations among neonates in the United States. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2006; 20(6):498-506.
- 45- Martin CR, Walker WA. Intestinal immune defences and the inflammatory response in necrotising enterocolitis. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006; 11: 369-377.
- 46- Henry MC, Lawrence Moss R. Surgical therapy for necrotizing enterocolitis: bringing evidence to the bedside. *Semin Pediatr Surg* 2005; 14: 181-190.
- 47- Schnabl KL, Van Aerde JE, Thomson AB, Clandinin MT. Necrotizing enterocolitis: a multifactorial disease with no cure. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(14): 2142-2161.
- 48- Lin PW, Nasr TR, Stoll BJ. Necrotizing enterocolitis: recent scientific advances in pathophysiology and prevention. *Semin Perinatol*. 2008; 32(2): 70-82.
- 49- Arnold M, Moore SW, Sidler D, Kirsten GF. Long-term outcome of surgically managed necrotizing enterocolitis in a developing country. *Pediatr Surg Int*. 2010; 26(4): 355-360.
- 50- Thompson AM, Bizzarro MJ. Necrotizing enterocolitis in newborns: pathogenesis, prevention and management. *Drugs*. 2008; 68(9):1227-38.

- 51- Berseth CL. Gastrointestinal motility in the neonate. *Clin Perinatol*. 1996; 23(2):179-190.
- 52- Lebenthal E, Lee PC. Development of functional responses in human exocrine pancreas. *Pediatrics*. 1980; 66(4):556-560.
- 53- Nusrat A, Turner JR, Madara JL. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000; 279(5):G851-857.
- 54- Hecht G. Innate mechanisms of epithelial host defense: spotlight on intestine. *Am J Physiol*. 1999; 277:C351-358.
- 55- Liu Z, Li N, Neu J. Tight junctions, leaky intestines, and pediatric diseases. *Acta Paediatr*. 2005; 94(4): 386-393.
- 56- Chokshi NK, Guner YS, Hunter CJ, Upperman JS, Grishin A, Ford HR. The role of nitric oxide in intestinal epithelial injury and restitution in neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol*. 2008; 32(2):92-99.
- 57- Shin CE, Falcone RA Jr, Stuart L, Erwin CR, Warner BW. Diminished epidermal growth factor levels in infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*. 2000; 35(2): 173-176.
- 58- Otte JM, Kiehne K, Herzig KH. Antimicrobial peptides in innate immunity of the human intestine. *J Gastroenterol*. 2003; 38(8):717-726.
- 59- Eckmann L. Defence molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections. *Curr Opin Gastroenterol*. 2005; 21(2):147-151.
- 60- Reber KM, Nankervis CA, Nowicki PT. Newborn intestinal circulation. Physiology and pathophysiology. *Clin Perinatol*. 2002; 29(1): 23-39.
- 61- Nowicki PT. Ischemia and necrotizing enterocolitis: where, when, and how? *Semin Pediatr Surg*. 2005; 14(3):152-158.
- 62- Bombell S, McGuire W. Early trophic feeding for very low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009 Jul 8;(3): CD000504.
- 63- Horton KK. Pathophysiology and current management of necrotizing enterocolitis. *Neonatal Netw*. 2005; 24(1): 37-46.

- 64-** Piazza AJ, Stoll BJ. Digestive system disorders. Behrman RE, Kliegman RB, Jenson HB, eds. Nelson Textbook of Pediatrics. Philadelphia: Saunders, Elsevier Science, 2008: 753-766.
- 65-** Henry MC, Moss RL. Current issues in the management of necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol.* 2004; 28(3): 221-233.
- 66-** Rees CM, Pierro A, Eaton S. Neurodevelopmental outcomes of neonates with medically and surgically treated necrotizing enterocolitis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2007; 92(3):F193-198.
- 67-** Roberts D, Dalziel S. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006 Jul 19;3: CD004454.
- 68-** Berseth CL, Bisquera JA, Paje VU. Prolonging small feeding volumes early in life decreases the incidence of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics.* 2003; 111(3):529-534.
- 69-** Sisk PM, Lovelady CA, Dillard RG, Gruber KJ, O'Shea TM. Early human milk feeding is associated with a lower risk of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *J Perinatol.* 2007;27(7): 428-433.
- 70-** Bury RG, Tudehope D. Enteral antibiotics for preventing necrotizing enterocolitis in low birthweight or preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2001;(1): CD000405.
- 71-** Alfaleh K, Bassler D. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008; 23;(1): CD005496.
- 72-** Deshpande G, Rao S, Patole S, Bulsara M. Updated meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates. *Pediatrics.* 2010;125(5):921-930.
- 73-** Ovalı F. Yenidoğanın immune sisteminin özellikleri ve gelişimi. In: Ovalı F eds. Yenidoğan Enfeksiyonları. İstanbul Medikal Yayıncılık, 2006: 29-68.
- 74-** Bellanti JA, Zeligs BJ, Pun YH. Immunology of the fetus and newborn. In: MacDonald MG, Seshia MMK, Mullet MD. Avery's

Neonatology. Pathophysiology and management of the newborn. 6th ed Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2005; 1134-1168.

75- Boxer LA. Neutrophils. In: Behrman RE, Kliegman RB, Jenson HB, eds. Nelson Textbook of Pediatrics. Philadelphia: Saunders, Elsevier Science, 2008: 895-899.

76- Buckley RH. The T-, B-, and NK-cell systems. Behrman RE, Kliegman RB, Jenson HB, eds. Nelson Textbook of Pediatrics. Philadelphia: Saunders, Elsevier Science, 2008: 873-879.

77- Johnston RB. Monocytes, Macrophages and Dendritic Cells. Behrman RE, Kliegman RB, Jenson HB, eds. Nelson Textbook of Pediatrics. Philadelphia: Saunders, Elsevier Science, 2008: 899-902.

78- Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*. 1970 May;18(5):723-737.

79- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995;155(3):1151-1164.

80- Holm TL, Nielsen J, Claesson MH. CD4+CD25+ regulatory T cells: I. Phenotype and physiology. *APMIS*. 2004;112(10): 629-641.

81- Bacchetta R, Gregori S, Roncarolo MG. CD4+ regulatory T cells: mechanisms of induction and effector function. *Autoimmun Rev*. 2005;4(8): 491-496.

82- Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity*. 2005;22(3):329-341.

83- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003; 4(4): 330-336.

84- Beyer M, Schultze JL. Plasticity of T(reg) cells: Is reprogramming of T(reg) cells possible in the presence of FOXP3? *Int Immunopharmacol*. 2010 Nov 27 [Epub ahead of print].

- 85-** Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol.* 2004;172(11): 6519-6523.
- 86-** Izcue A, Powrie F. Special regulatory T-cell review: Regulatory T cells and the intestinal tract--patrolling the frontier. *Immunology.* 2008;123(1):6-10.
- 87-** Uhlig HH, Coombes J, Mottet C, Izcue A, Thompson C, Fanger A, Tannapfel A, Fontenot JD, Ramsdell F, Powrie F. Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J Immunol.* 2006;177(9): 5852-5860.
- 88-** Stephens GL, McHugh RS, Whitters MJ, Young DA, Luxenberg D, Carreno BM, Collins M, Shevach EM. Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+CD25+ T cells. *J Immunol.* 2004;173(8): 5008-5020.
- 89-** Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity.* 2004;21(4):589-601.
- 90-** Shevach EM, DiPaolo RA, Andersson J, Zhao DM, Stephens GL, Thornton AM. The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Immunol Rev.* 2006;212: 60-73.
- 91-** Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier LL. .NK cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2005;17(1):29-35.
- 92-** Berger M. Complement deficiency and neutrophil dysfunction as risk factors for bacterial infection in newborns and the role of granulocyte transfusion in therapy. *Rev Infect Dis.* 1990;12 Suppl 4: S401-409.
- 93-** Johansson J, Gudmundsson GH, Rottenberg ME, Berndt KD, Agerberth B. Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *J Biol Chem.* 1998;273(6): 3718-3724.
- 94-** Schröder JM. Epithelial antimicrobial peptides: innate local host response elements. *Cell Mol Life Sci.* 1999; 56(1-2): 32-46.

- 95-** Marchini G, Lindow S, Brismar H, Ståbi B, Berggren V, Ulfgren AK, Lonne-Rahm S, Agerberth B, Gudmundsson GH. The newborn infant is protected by an innate antimicrobial barrier: peptide antibiotics are present in the skin and vernix caseosa. *Br J Dermatol.* 2002;147(6):1127-1134.
- 96-** Sorensen M, Sorensen MPL. The proteins in whey. *C.R. Trav. Lab. Carlsberg*, 1939; 23:55-59.
- 97-** Groves ML. The isolation of a red protein from milk. *J Am Chem Soc* 1960; 83:3345-3350.
- 98-** Ward PP, Uribe-Luna S, Conneely OM. Lactoferrin and host defense. *Biochem Cell Biol.* 2002;80(1):95-102.
- 99-** González-Chávez SA, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q *Int J Antimicrob Agents.* Lactoferrin: structure, function and applications. 2009; 33(4): 301.e1-8.
- 100-** Conneely OM. Antiinflammatory activities of lactoferrin. *J Am Coll Nutr.* 2001; 20(5 Suppl): 389S-395S
- 101-** Bennett RM, Kokocinski T. Lactoferrin content of peripheral blood cells. *Br J Haematol.* 1978; 39(4):509-521.
- 102-** Maaks S, Yan HZ, Wood WG. Develeopment and evaluation of luminescence based sandwich assay for plasma lactoferrin as a marker for sepsis and bacterial infections in pediatric medicine. 1989; 3: 221-226.
- 103-** Yamauchi K, Wakabayashi H, Shin K, Takase M. Bovine lactoferrin: benefits and mechanism of action against infections. *Biochem Cell Biol.* 2006; 84(3):291-296.
- 104-** Siimes MA, Salmenperä L, Perheentupa J. Exclusive breast-feeding for 9 months: risk of iron deficiency. *J Pediatr.* 1984;104(2):196-199.
- 105-** Iyer S, Lönnerdal B. Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism. *Eur J Clin Nutr.* 1993;47(4):232-241.
- 106-** Jenssen H, Hancock RE. Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie.* 2009; 91(1):19-29.
- 107-** Dalmastri C, Valenti P, Visca P, Vittorioso P, Orsi N. Enhanced antimicrobial activity of lactoferrin by binding to the bacterial surface. *Microbiologica.* 1988;11(3):225-230.

- 108-** Ekins A, Khan AG, Shouldice SR, Schryvers AB. Lactoferrin receptors in gram-negative bacteria: insights into the iron acquisition process. *Biometals*. 2004;17(3):235-243.
- 109-** Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh MJ. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*. 2002; 30;417(6888):552-555.
- 110-** Leitch EC, Willcox MD. Lactoferrin increases the susceptibility of *S. epidermidis* biofilms to lysozyme and vancomycin. *Curr Eye Res*. 1999;19(1):12-19.
- 111-** Ochoa TJ, Clearly TG. Lactoferrin disruption of bacterial type III secretion systems. *Biometals*. 2004;17(3): 257-260.
- 112-** Ellison RT 3rd, Giehl TJ, LaForce FM. Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infect Immun*. 1988; 56(11): 2774-1781.
- 113-** Harmsen MC, Swart PJ, de Béthune MP, Pauwels R, De Clercq E, The TH, Meijer DK. Antiviral effects of plasma and milk proteins: lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro. *J Infect Dis*. 1995;172(2):380-388.
- 114-** Marchetti M, Trybala E, Superti F, Johansson M, Bergström T. Inhibition of herpes simplex virus infection by lactoferrin is dependent on interference with the virus binding to glycosaminoglycans. *Virology*. 2004;318(1):405-413.
- 115-** Wakabayashi H, Abe S, Okutomi T, Tansho S, Kawase K, Yamaguchi H. Cooperative anti-Candida effects of lactoferrin or its peptides in combination with azole antifungal agents. *Microbiol Immunol*. 1996;40(11): 821-825.
- 116-** Legrand D, Ellass E, Carpentier M, Mazurier J. Interactions of lactoferrin with cells involved in immune function. *Biochem Cell Biol*. 2006;84(3): 282-290.
- 117-** Legrand D, Ellass E, Carpentier M, Mazurier J. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci*. 2005; 62(22): 2549-2559.

- 118-** Wakabayashi H, Takakura N, Yamauchi K, Tamura Y. Modulation of immunity-related gene expression in small intestines of mice by oral administration of lactoferrin. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13(2):239-245.
- 119-** Deriy LV, Chor J, Thomas LL. Surface expression of lactoferrin by resting neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 275(1):241-246.
- 120-** Bellamy W, Takase M, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J Appl Bacteriol.* 1992;73(6): 472-479.
- 121-** Lönnerdal B. Nutritional roles of lactoferrin. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2009;12(3): 293-297.
- 122-** Richardson DK, Corcoran JD, Escobar GJ, Lee SK. SNAP-II and SNAPPE-II: Simplified newborn illness severity and mortality risk scores. *J Pediatr.* 2001;138(1): 92-100.
- 123-** Liggins GC, Howie RN. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics.* 1972;50(4):515-525.
- 124-** National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. Effect of corticosteroids for fetal maturation on perinatal outcomes, February 28-March 2, 1994. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173:246-252.
- 125-** Brownfoot FC, Crowther CA, Middleton P. Different corticosteroids and regimens for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008;(4): CD006764.
- 126-** SUPPORT Study Group of the Eunice Kennedy Shriver NICHD Neonatal Research Network, Early CPAP versus surfactant in extremely preterm infants. *N Engl J Med.* 2010;362(21):1970-1979.
- 127-** Manzoni P, Decembrino L, Stolfi I, Pugni L, Rinaldi M, Cattani S, Romeo MG, Messner H, Laforgia N, Vagnarelli F, Memo L, Bordignon L, Saia OS, Maule M, Gallo E, Mostert M, Magnani C, Quercia M, Bollani L, Pedicino R, Renzullo L, Betta P, Ferrari F, Magaldi R, Mosca F, Stronati M, Farina D; Italian Task Force for the Study and Prevention of Neonatal Fungal

Infections; Italian Society of Neonatology. Bovine lactoferrin supplementation for prevention of late-onset sepsis in very low-birth-weight neonates: a randomized trial. *JAMA*. 2009; 302(13): 1421-1428.

128- Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 2008; 371(9606): 75-84.

129- August Fuhr N, Becker C, van Baalen A, Bauer K, Hopp H. Antibiotic therapy for preterm premature rupture of membranes - results of a multicenter study. *J Perinat Med*. 2006;34(3):203-206.

130- Ables AZ, Romero AM, Chauhan SP. Use of calcium channel antagonists for preterm labor. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2005;32(3): 519-525.

131- Conde-Agudelo A, Romero R, Kusanovic JP. Nifedipine in the management of preterm labor: a systematic review and metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol*. 2011; 204(2):134.e1-134.e20.

132- Fanaroff AA, Stoll BJ, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Stark AR, Bauer CR, Donovan EF, Korones SB, Laptook AR, Lemons JA, Oh W, Papile LA, Shankaran S, Stevenson DK, Tyson JE, Poole WK; NICHD Neonatal Research Network. Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;196(2):147.e1-8.

133- Basso O, Rasmussen S, Weinberg CR, Wilcox AJ, Irgens LM, Skjaerven R. Trends in fetal and infant survival following preeclampsia. *JAMA* 2006;296:1357-1362.

134- Ngoc NT, Merialdi M, Abdel-Aleem H, Carroli G, Purwar M, Zavaleta N, et al. Causes of stillbirths and early neonatal deaths: data from 7993 pregnancies in six developing countries. *Bull World Health Organ* 2006;84: 699-705.

135- Ersch J, Baenziger O, Bernet V, Bucher HU. Feeding problems in preterm infants of preeclamptic mothers. *J Paediatr Child Health*. 2008; 44(11):651-5.

136- Cetinkaya M, Ozkan H, Köksal N, Karali Z, Ozgür T. Neonatal outcomes of premature infants born to preeclamptic mothers. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2010;23(5): 425-430.

- 137-** Procianoy RS, Silveira RC, Mussi-Pinhata MM, Souza Rugolo LM, Leone CR, de Andrade Lopes JM, de Almeida MF; Brazilian Network on Neonatal Research. Sepsis and neutropenia in very low birth weight infants delivered of mothers with preeclampsia. *J Pediatr*. 2010;157(3):434-438.
- 138-** Teng RJ, Wu TJ, Garrison RD, Sharma R, Hudak ML. Early neutropenia is not associated with an increased rate of nosocomial infection in very low-birth-weight infants. *J Perinatol*. 2009;29(3):219-224.
- 139-** Bevilacqua G, Parmigiani S, on behalf of the OBSERVES Group: An observational study of surfactant treatment in infants of 23–30 weeks' gestation: comparison of prophylaxis and early rescue. *J Mater Fetal Neonatal Med* 2003;14:197-204.
- 140-** Soll RF, Morley CJ. Prophylactic versus selective use of surfactant in preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2001;(2): CD000510.
- 141-** Sweet DG, Carnielli V, Greisen G, Hallman M, Ozek E, Plavka R, Saugstad OD, Simeoni U, Speer CP, Halliday HL; European Association of Perinatal Medicine. European consensus guidelines on the management of neonatal respiratory distress syndrome in preterm infants - 2010 update. *Neonatology*. 2010;97(4):402-417.
- 142-** Aly H, Milner JD, Patel K, El-Mohandes AA. Does the experience with the use of nasal continuous positive airway pressure improve over time in extremely low birth weight infants? *Pediatrics*. 2004;114(3):697–702.
- 143-** Meyer M, Mildenhall L, Wong M. Outcomes for infants weighing less than 1000 grams cared for with a nasal continuous positive airway pressure-based strategy. *J Paediatr Child Health*. 2004; 40(1–2):38–41.
- 144-** Aly H, Massaro AN, Hammad TA, Narang S, Essers J. Early nasal continuous positive airway pressure and necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Pediatrics*. 2009;124(1): 205-210.
- 145-** Havranek T, Thompson Z, Carter JD. Factors that influence mesenteric blood flow velocity in newborn preterm infants. *J Perinatol*. 2006; 26(8):493–497.

- 146-** Gounaris A, Costalos C, Varchalama L, Kokori P, Kolovou E, Alexiou N. Gastric emptying in very-low-birth-weight infants treated with nasal continuous positive airway pressure. *J Pediatr.* 2004; 145(4):508–510.
- 147-** The Vermont-Oxford Trials Network: Very low birth weight outcomes for 1990. *Pediatrics.* 1993; 91:540–545.
- 148-** Cotton RB, Stahlman MT, Bender HW, Graham TP, Catterton WZ, Kovar I. Randomized trial of early closure of symptomatic patent ductus arteriosus in small preterm infants. *J Pediatr.* 1978;93: 647–651.
- 149-** Gersony WM, Peckham GJ, Ellison RC, Miettinen OS, Nadas AS. Effects of indomethacin in premature infants with patent ductus arteriosus: results of a national collaborative study. *J Pediatr.* 1983;102: 895–906.
- 150-** Hammerman C, Shchors I, Jacobson S, Schimmel MS, Bromiker R, Kaplan M, Nir A. Ibuprofen versus continuous indomethacin in premature neonates with patent ductus arteriosus: is the difference in the mode of administration? *Pediatr Res.* 2008; 64(3): 291-297.
- 151-** Ohlsson A, Walia R, Shah SS. Ibuprofen for the treatment of patent ductus arteriosus in preterm and/or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010; (4): CD003481.
- 152-** Clark RH, Bloom BT, Spitzer AR, Gerstmann DR. Reported medication use in the neonatal intensive care unit: data from a large national data set. *Pediatrics* 2006;117(6):1979–1987.
- 153-** Cotten CM, Taylor S, Stoll B, Goldberg RN, Hansen NI, Sánchez PJ, Ambalavanan N, Benjamin DK Jr; NICHD Neonatal Research Network. Prolonged duration of initial empirical antibiotic treatment is associated with increased rates of necrotizing enterocolitis and death for extremely low birth weight infants. *Pediatrics.* 2009;123(1):58-66.
- 154-** Clark RH, Bloom BT, Spitzer AR, Gerstmann DR. Empiric use of ampicillin and cefotaxime, compared with ampicillin and gentamicin, for neonates at risk for sepsis is associated with an increased risk of neonatal death. *Pediatrics* 2006;117(1):67–74.

- 155-** Olsen AL, Reinholdt J, Jensen AM, Andersen LP, Jensen ET. Nosocomial infection in a Danish Neonatal Intensive Care Unit: a prospective study. *Acta Paediatr.* 2009; 98(8):1294-1299.
- 156-** Sisk PM, Lovelady CA, Gruber KJ, Dillard RG, O'Shea TM. Human milk consumption and full enteral feeding among infants who weigh $\leq$ 1250 grams. *Pediatrics.* 2008;121(6): e1528-1533.
- 157-** King JC Jr, Cummings GE, Guo N, Trivedi L, Readmond BX, Keane V, Feigelman S, de Waard R. A double-blind, placebo-controlled, pilot study of bovine lactoferrin supplementation in bottle-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007;44(2):245-251.
- 158-** Hentschel J, Brüngger B, Stüdi K, Mühlemann K. Prospective surveillance of nosocomial infections in a Swiss NICU: low risk of pneumonia on nasal continuous positive airway pressure? *Infection.* 2005;33(5-6):350-355.
- 159-** Schulman J, Stricof RL, Stevens TP, Holzman IR, Shields EP, Angert RM, Wasserman-Hoff RS, Nafday SM, Saiman L; New York State Regional Perinatal Centers; New York State Department of Health. Development of a statewide collaborative to decrease NICU central line-associated bloodstream infections. *J Perinatol.* 2009;29(9): 591-599.
- 160-** Ohlsson A, Lacy J. Intravenous immunoglobulin for suspected or subsequently proven infection in neonates. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010; (3): CD001239.
- 161-** Haque KN, Zaidi MH, Bahakim H. IgM-enriched intravenous immunoglobulin therapy in neonatal sepsis. *Am J Dis Child.* 1988; 142(12): 1293-1296.
- 162-** Erdem G, Yurdakök M, Tekinalp G, Ersoy F. The use of IgM-enriched intravenous immunoglobulin for the treatment of neonatal sepsis in preterm infants. *Turk J Pediatr.* 1993;35(4): 277-281.
- 163-** Tarnow-Mordi W, Isaacs D, Dutta S. Adjunctive immunologic interventions in neonatal sepsis. *Clin Perinatol.* 2010;37(2):481-499.
- 164-** Geffers C, Baerwolff S, Schwab F, Gastmeier P. Incidence of healthcare-associated infections in high-risk neonates: results from the

German surveillance system for very-low-birthweight infants. *J Hosp Infect.* 2008; 68(3): 214-221.

165- Benjamin DK Jr, Stoll BJ, Gantz MG, Walsh MC, Sánchez PJ, Das A, Shankaran S, Higgins RD, Auten KJ, Miller NA, Walsh TJ, Laptook AR, Carlo WA, Kennedy KA, Finer NN, Duara S, Schibler K, Chapman RL, Van Meurs KP, Frantz ID 3rd, Phelps DL, Poindexter BB, Bell EF, O'Shea TM, Watterberg KL, Goldberg RN; Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Neonatal candidiasis: epidemiology, risk factors, and clinical judgment. *Pediatrics.* 2010;126(4): e865-873.

166- Tarcan A, Gürakan B, Tiker F, Ozbek N. Influence of feeding formula and breast milk fortifier on lymphocyte subsets in very low birth weight premature newborns. *Biol Neonate.* 2004; 86(1): 22-28.

167- Hawkes JS, Neumann MA, Gibson RA. The effect of breast feeding on lymphocyte subpopulations in healthy term infants at 6 months of age. *Pediatr Res.* 1999; 45(5 Pt 1): 648-651.

168- Sherman MP, Bennett SH, Hwang FF, Yu C. Neonatal small bowel epithelia: enhancing anti-bacterial defense with lactoferrin and *Lactobacillus* GG. *Biometals.* 2004;17(3): 285-289.

169- Nielsen SM, Hansen GH, Danielsen EM. Lactoferrin targets T cells in the small intestine. *J Gastroenterol.* 2010;45(11):1121-1128.

170- Bennett RM, Davis J. Lactoferrin binding to human peripheral blood cells: an interaction with a B-enriched population of lymphocytes and a subpopulation of adherent mononuclear cells. *J Immunol.* 1981;127(3):1211-1216.

171- Cheroutre H. Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22: 217-246.

172- Actor JK, Hwang SA, Kruzel ML. Lactoferrin as a natural immune modulator. *Curr Pharm Des.* 2009;15(17):1956-1973.

173- Smits HH, Engering A, van der Kleij D, de Jong EC, Schipper K, van Capel TM, Zaat BA, Yazdanbakhsh M, Wierenga EA, van Kooyk Y, Kapsenberg ML. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing

regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115(6):1260-1267.

174- Hein F, Massin F, Cravoisy-Popovic A, Barraud D, Levy B, Bollaert PE, Gibot S. The relationship between CD4+CD25+CD127- regulatory T cells and inflammatory response and outcome during shock states. *Crit Care.* 2010;14(1): R19.

175- Monneret G, Debard AL, Venet F, Bohe J, Hequet O, Bienvenu J, Lepape A. Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Crit Care Med.* 2003;31(7): 2068-2071.

176- Venet F, Pachot A, Debard AL, Bohé J, Bienvenu J, Lepape A, Monneret G. Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes. *Crit Care Med.* 2004;32(11):2329-2331.

177- Heuer JG, Zhang T, Zhao J, Ding C, Cramer M, Justen KL, Vonderfecht SL, Na S. Adoptive transfer of in vitro-stimulated CD4+CD25+ regulatory T cells increases bacterial clearance and improves survival in polymicrobial sepsis. *J Immunol.* 2005; 174(11): 7141-7146

178- Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol.* 2004; 5(3): 266-271.

179- Steinborn A, Haensch GM, Mahnke K, Schmitt E, Toerner A, Meuer S, Sohn C. Distinct subsets of regulatory T cells during pregnancy: is the imbalance of these subsets involved in the pathogenesis of preeclampsia? *Clin Immunol.* 2008;129(3):401-412.

180- Yıldırım A. Doğum şeklinin kordon kanı regülatur T hücreleri (TREG) üzerine etkisi. Ankara Üniversitesi, Çocuk İmmünoloji-Allerji Bilim Dalı, Çocuk İmmünolojisi Yan Dal Uzmanlık Tezi, 2008, Ankara.

Ek 1

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Sayın Veli,

Öncelikle yeni bebeğiniz hayırlı olsun.

Bebeğiniz zamanından önce ve çok küçük olarak doğdu. Sadece erken ve/veya küçük doğmuş olmasından dolayı bir çok riski beraberinde getirdi. Bu riskler arasında hayatı tehlikeye sebep olabilecek iki hastalıktan size bahsetmek istiyorum.

- 1- Sepsis: Bebeğinizin bağışıklık sistemi, erken doğmuş olmasından dolayı henüz çok tecrübesiz; bu nedenle herhangi bir mikrobun vücuduna girmesi, yayılarak çeşitli bulgu ve belirtilere yol açması çok kolay. Bu oldukça önemli ve ölüm nedeni olabilecek bir hastalık durumudur. Biz bebeğiniz servisimizde yattığı süre içerisinde herhangi bir mikropla temas etmemesi için gerekenleri yapacağız ve herhangi bir enfeksiyon belirtisi ortaya çıktığında gereken tedaviyi uygulayacağız.
- 2- NEK (Nekrotizan enterokolit): Bebeğinizin bağırsakları, erken doğuma bağlı olarak yeterli derecede olgunlaşmadığı için bu hastalık için risk altında. Beslenmesini anne sütü ile yapmak, günlük beslenmesini yavaş yavaş arttırmak bağırsaklarını bu hastalıktan korumak için etkinliği gösterilmiş yaklaşımlardır. Bu hastalığın çocuğunuzda geliştiğinden şüphelendiğimiz zaman beslenmesini kesip, bağırsaklarını dinlenmeye alacağız ve etkili antibiyotik tedavisine başlayacağız. Ancak herşeye rağmen bağırsağın bir kısmında çürüme ve delinme olabilir. Böyle bir durumda bebeğinizin ameliyat edilmesi gerekebilir.

Size araştırmamızda kullanacağımız ve eğer onay verirsiniz sizin bebeğinizde de kullanabileceğimiz bir maddeden bahsetmek istiyorum. Bu maddenin adı LAKTOFERRİN. Laktoferrin bağışıklık sistemini mikroplara karşı güçlendiren, mikropları öldürebilen bir madde. Bu madde anne sütünde özellikle de doğumdan sonra ilk haftadaki anne sütünün (ağız sütü) içinde çok bol miktarda bulunuyor. Zaten eğer bebeğiniz zamanında doğabilseydi, sadece annesinin sütünü emerek bu faydalı maddeden bol miktarda vücuduna alabilecekti. Ama bebeğiniz çok küçük ve özellikle ilk hafta içerisinde annesinin sütü ile çok az beslenebilecek ve annesinin sütünde doğal olarak bulunan bu maddeden yeteri kadar alamayacak. Araştırmamızda sepsis ve NEK için risk altında olan bebeklere bu maddeden vererek onları bu hastalıklardan koruyup koruyamayacağımızı göstermeyi amaçlıyoruz.

Araştırmamıza servisimize yatan doğum ağırlığı 1500 g'ın altında olan 60 bebeği almayı planlıyoruz. Bu bebekleri 2 gruba ayırmayı planlıyoruz. 1. gruptaki hastalarımıza beslenme başladığı andan itibaren ve yattığı süre boyunca her gün herhangi bir yan etkisi bulunmayan LAKTOFERRİN isimli maddeyi anne sütü/mama ile birlikte vereceğiz. 2. gruptaki hastalarımıza ise beslenme başladığı andan itibaren ve yattığı süre boyunca her gün 1 cc serumu anne sütü/mama ile birlikte vereceğiz.

Araştırmamıza katılan bebeklerden ilk doğduklarında ve taburcu olurken rutin olarak kan sayımı için aldığımız kan örneklerinden artan kandan bağışıklık sistemlerini değerlendireceğimiz bir tetkik yapacağız. Bu tetkik için çocuğunuzdan fazladan kan alınması yada bunun size bir maliyet getirmesi söz konusu değildir. Kan alınması sırasında kan alınan yerde morarma dışında olabilecek olumsuzluklar çok çok nadirdir.

Velisi olarak bebeğinizin bu araştırmaya katılmasını red etme hakkına sahipsiniz, ayrıca bebeğinizin çalışmaya katılması yönündeki olur kararınızı istediğiniz zaman geri çekebilirsiniz. Araştırmacılar sizin bilginiz dışında çeşitli nedenlerle bebeğinizi çalışmadan çıkarabileceklerdir. Velisi olarak bebeğinizin araştırmaya katılmasını kabul etmemeniz, bebeğinizin tarafımızdan izlemine ve serviste yattığı süre içerisinde gereken tedavi yöntemlerini hiçbir şekilde değiştirmeyecektir. Araştırma kapsamında yer alan laktoferrin desteği ve yapılacak olan laboratuvar incelemesi ile ilgili, bebeğin ailesi ve sosyal güvencesini sağlayan kurum hiçbir yük altına girmeyecektir. Kan tetkiklerinin ücreti, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Ofisi'nden alınacak proje destek bütçesinden karşılanacaktır.

Bu araştırma Doç.Dr. Begüm ATASAY sorumluluğunda Uzm.Dr. İlke MÜNGAN AKIN tarafından yürütülmektedir. Araştırma ile ilgili her türlü sorularınızı Uzm.Dr. İlke MÜNGAN AKIN'a yöneltebilirsiniz. Her an ulaşabileceğiniz numarası: 0505 255 19 89

ONAM FORMU

Bu araştırma bana anlatıldı. Araştırma ile ilgili tüm sorularıma tatmin edici yanıtlar aldım. Bu bilgiler ışığında bebeğimin araştırmaya gönüllü olarak katılmasını kabul ediyorum.

Tarih:

Bebeğin Adı

Bebeğin velisinin adı-soyadı

Hekim

Dr. İlke MÜNGAN AKIN

İmza

İmza

Ek 2

YENİDOĞAN YOĞUN BAKIM ÜNİTESİNDE YATAN ÇOK DÜŞÜK DOĞUM AĞIRLIKLIL BEBEKLERİN SEPSİS VE NEK GELİŞİMİNİ ENGELLEMELİ YÖNELİK ORAL LAKTOFERRİN PROFİLAKSİSİ VE T- REGULATUAR HÜCRELER ÜZERİNE ETKİSİ

Hasta Adı:		Laktoferrin:
Dosya No:		Kontrol:
Doğum Tarihi:	Gestasyon Haftası:	Doğum ağırlığı:

PRENATAL

Prenatal steroid:	Tarih:
Annede enfeksiyon:	
Annede preeklamsi/eklamsi/HELLP:	
Annede kronik hastalık:	
Gebelikte ilaç kullanımı:	Ne: Ne zaman:

NATAL

Doğum şekli:	APGAR:	Resesütasyon?
Hipotermi (<36°C):		İlk Kangazı:
RDS:	Survanta/Curosuf	Kaçıncı saat
MV:	PTV (st)	SIMV (st)
Antibiyotik		İmmünmodulasyon:
		G-CSF: Penta:
Göbek ven kateteri:		Göbek arter kateteri:
Takıldığı gün:		Takıldığı gün:
Çıkarıldığı gün:		Çıkarıldığı gün:
Üreme:		Üreme:
TKS	PY:	CRP:
	(IT:)	

PDA: Tedavi: Kaçıncı gün:	Ölüm:	TA:	Taşikardi:
Sepsis Atağı(1): Tarih:	Klinik: Tedavi:	Lab:	Kültür:
Sepsis Atağı(2): Tarih:	Klinik: Tedavi:	Lab:	Kültür:
Sepsis Atağı(3): Tarih:	Klinik: Tedavi:	Lab:	Kültür:
NEK Tarih:	Klinik: Tedavi:	Lab:	Kültür:

TABURCULUK

Taburcu Tarihi:		Sağlıklı:		EX:
Taburculuk VA:		Boy:	BÇ:	
Beslenme şekli/içeriği/volüm:				
TKS (taburculuk):			Rtc:	
Biyokimya:				
İlaç:				
BPD:	Tedavi:	Kaçıncı güne kadar O2/CPAP?		Eve O2:
ROP:	Evre:	Lazer:		
Kraniyal USG:		Kraniyal MR:		
VEP:		BAER:		

KONTROL (Tarih)	TY/DY	VA/Boy/BÇ	BeslenmeŞekli/ İçeriği/Volüm	Lab	Gelişimsel

Serviste Yatış Süresince Takip

Gün	VA	Sıvı	İçerik	Oral içerik/volüm/ beslenme şekli	Dışkılama sayısı/ uyarı?/lavman?	intolerans/ distansiyon	kusma/	İlaç	Lab
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									
11									
12									
13									

29														
30														
31														
32														
33														
34														
35														
36														
37														
38														
39														
40														
41														
42														
43														

Ek 3

**YENİDOĞAN YOĞUN BAKIM ÜNİTESİNDE YATAN ÇOK DÜŞÜK DOĞUM
AĞIRLIKLI BEBEKLERİN SEPSİS VE NEK GELİŞİMİNİ ENGELLEMeye
YÖNELİK ORAL LAKTOFERRİN PROFİLAKSİSİ VE T- REGULATUAR
HÜCRELER ÜZERİNE ETKİSİ
(Dr. İlke Mungan Akın)**

Hasta Adı:		Laktoferrin:
Dosya No:		Kontrol:
Doğum Tarihi:	Gestasyon Haftası:	Doğum ağırlığı:
Prenatal steroid:		Tarih:
Annede enfeksiyon:		
Annede preeklamsi/eklamsi/HELLP:		
Annede kronik hastalık:		
Gebelikte ilaç kullanımı:	Ne:	Ne zaman:
Doğum şekli:		

Örnek alınma tarihi:		PN:
Örnek alındığında:		
Enfeksiyon:	NEK:	Mikroorganizma:
Antibiyotik		İmmünmodulasyon:
		G-CSF: Penta:
TKS	PY:	CRP:
	(IT:)	

Ek 4

SNAPPE-II Skorlama Sistemi

Değişken	Puan
Ortalama Kan Basıncı	
20-29 mmHg	9
<20 mmHg	19
En düşük vücut ısı	
35-35,6 °C	8
<35 °C	15
PO₂/FiO₂ oranı	
1.0-2.49	5
0.33-0.99	16
<0.33	28
En düşük kan pH'sı	
7.10-7.19	7
<7.10	16
Nöbet	19
İdrar çıkışı	
0.1-0.9 ml/kg/gün	5
<0.1 ml/kg/gün	18
Doğum ağırlığı	
750-999 g	10
<750 g	17
Gestasyon yaşına göre doğum ağırlığı <3p	12
APGAR skoru 5. dak <7	18