

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

Prof. Dr. Adnan ABASIYANIK
ANABİLİM DALI BAŞKANI

**DENEYSEL NEKROTİZAN ENTEROKOLİT MODELİNDE ORAL YOLDAN
VERİLEN İMMÜNGLOBÜLİN A NIN ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Bahattin AYDOĞDU

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Engin GÜNEL

KONYA-2007

İÇİNDEKİLER:

- 1. KISALTMALAR**
- 2. GİRİŞ VE AMAÇ**
- 3. GENEL BİLGİLER**
 - 3.1. NEKROTİZAN ENTEROKOLİT
 - 3.2. NEK VE İMMÜNGLOBULİNLER
 - 3.3 MİYELOPEROKSİDAZ
 - 3.4. SİTOKİNLER
 - 3.5. APOPİTOZİS
 - 3.6. CD 4
- 4. MATERYAL VE METOD**
 - 4.1. DENEYSEL ÇALIŞMA
 - 4.2. NEK OLUŞTURULMASI
 - 4.3. ÇALIŞMA GRUPLARI
 - 4.4. DEĞERLENDİRME
 - 4.5. İSTATİSTİK ANALİZ
- 5. BULGULAR**
 - 5.1. SAĞ KALIM ORANLARI
 - 5.2. AĞIRLIK DEĞİŞİMİ
 - 5.3. MAKROSKOPİK BULGULAR
 - 5.4. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR
 - 4.5. APOPİTOZİS BULGULARI
 - 5.6. DOKU CD4 DEĞERLERİ
 - 5.7. DOKU MPO DEĞERLERİ
 - 5.8. IL-6 DOKU DEĞERLERİ
 - 5.9. DOKU TNF- α DEĞERLERİ
- 6. TARTIŞMA VE SONUÇ**
- 7. ÖZET**
- 8. SUMMARY**
- 9. KAYNAKLAR**

1. KISALTMALAR

- IG A ----- : İmmünglobülin A
- Ig G ----- : İmmünglobülin G
- Ig M ----- : İmmünglobülin M
- NO ----- : Nitrik Oksit
- iNOS ----- : İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentetaz
- cNOS ----- : Oluşturulan Nitrik Oksit Sentetaz
- K -----: Kontrol Grubu
- N ----- : Nekrotizan Enterokolit Grubu
- S ----- : Şem Grubu
- T -----: Tedavi Grubu
- NEK ----- : Nekrotizan Enterokolit
- GİS ----- : Gastrointestinal Sistem
- PAF ----- : Trombosit Aktive Edici Faktör
- TNF- α ----- : Tümör Nekrozis Faktör Alfa
- MPO ----- : Miyeloperoksidaz
- İL-6 ----- : İnterlökin 6
- İFN ----- : İnterferon
- LPS ----- : Lipopolisakkarit
- DDA----- : Düşük doğum ağırlıklı

2. GİRİŞ VE AMAÇ

Nekrotizan enterokolit (NEK) yenidoğanların en sık acil cerrahi müdahale gerektiren, mukozadan başlayıp tüm katları tutabilen inflamasyon ve nekroz ile karakterize, gastrointestinal sistemin (GİS) ilerleyici bir hastalığıdır. NEK, klasik olarak prematür ve düşük doğum ağırlıklı (DDA) bebeklerin hastalığı olarak bilinir. NEK'e bağlı ölüm insidansı gittikçe artmaktadır. Yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde hasta takip ve tedavi uygulamalarının gelişmesi ile özellikle yenidoğanın respiratuar distres sendromu tedavisinde başarı sağlanması ve prematüre bakımının gelişmesi bu hastalığın görülme sıklığını daha da arttırmıştır ^{1,2}.

Önemi gittikçe artmasına rağmen hastalığın etyopatogenezi tam olarak ortaya konulamamıştır. Prematürite, hipoksi, beslenme, farmakolojik ajanlar, infeksiyon, sitokinler, barsak bariyerinin bozulmasına sebep olan etkenler gibi birçok faktör suçlanmaktadır. Ama bunlar arasında kesinleşmiş etyolojik faktör henüz ortaya konamamıştır ^{1,2}.

NEK klasik olarak prematüre ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerin hastalığı olduğundan, sadece barsağın koruyucu faktörlerinin immatüritesinden kaynaklanıyor olması daha akla yatkın gelmektedir. Bu bariyer lümenindeki bakterilerin sisteme ulaşmasını engelleyecek karmaşık anatomik ve fonksiyonel özelliklere sahiptir. Bariyerin spesifik kanadında yer alan immün sistem komponentleri B ve T hücreleri ve immünglobülinlerdir. Yenidoğan bebeklerde intestinal B ve T lenfositleri düşük sayıdadır. Prematür bebeklerin barsaklarındaki sekretuar IgA, IgG ve IgM düzeyleri düşüktür. IgA bakterileri bağlayarak onların barsak mukozasına yapışmalarını önleyen barsağın koruyucu mukozal bariyerinin oluşmasında hayati bir öneme sahiptir ^{3,4}. NEK riski taşıyan yenidoğanlarda yapılan çalışmaların bir kısmında oral verilen kombine immünglobülinlerin NEK insidansını azalttığı ortaya konarken bir kısmında ise koruyucu etkilerinin olmadığını gösteren çalışmalar vardır ^{3,5-}

¹¹. Ancak immünglobülin A'nın tek başına oral yolla verildiğinde NEK oluşumunu önleyici etkisini araştıran çalışmalara literatürde rastlanmamıştır ⁹.

Çalışmamızda; deneysel olarak oluşturulan nekrotizan enterokolit modelinde, oral yoldan verilen immünglobülin A'nın rat barsağını koruyucu etkisini araştırmayı amaçladık.

3. GENEL BİLGİLER

3.1.NEKROTİZAN ENTEROKOLİT

NEK, düşük doğum ağırlıklı ve prematür yenidoğanların GİS'ini tutan ve ölümcül seyreden hastalıdır. Çocuk Cerrahisi açısından önemi gittikçe artan ve birçok yönden tam olarak anlaşılamayan NEK, 1960 yılının ortalarına kadar infantların mortalite ve morbiditesinde önemli bir sebep değildi. Daha sonra yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde GİS'in önemli bir hastalığı olarak öne çıktı. NEK, yenidoğanlarda en sık acil cerrahi gerektiren bir patoloji olup, diğer cerrahi müdahale gerektiren GİS hastalıklarından daha yüksek mortaliteye sahiptir ¹².

NEK her ne kadar mideden anüse kadar GİS'i tutabilse de, daha çok distal ince barsak ve proksimal kolonu tutan, sınırlı mukozal harabiyetten total nekroza kadar değişen bir spektrum gösterir ¹³. Son 30 yıl içindeki bilgi birikimine ve yenidoğan yoğun bakım tekniklerindeki ilerlemelere rağmen, NEK mortalitesi hala diğer konjenital gastrointestinal anomalilerden daha yüksektir ⁴. Mortalite oranı %10–50 arasında değişmektedir ve pannekrozda oran daha da artmaktadır ¹⁴.

Çok sayıdaki klinik ve deneysel çalışmaya rağmen NEK patogenezi tam olarak anlaşılmış değildir.

NEK etyopatogenezi tam olarak ortaya konulamadığından, multifaktöriyel olduğu kabul edilir. Retrospektif olarak yapılan çalışmalarda bu hastalığın ortaya çıkışında barsak mukozası kan akımını azaltan durumların, hipoksinin, prematür bebeğin barsak motilitesindeki bozukluğun ve immatür bir mukozal bariyere sahip olmasının, hiperosmolar beslenmenin ve bazı enfeksiyon ajanlarının sorumlu olduğu bildirilmiştir ^{3,15-18}.

3.1.1. TARİHÇE

Yaklaşık 150 yıldır literatürde benzer klinik tablolarla seyreden hastalıklar bildirilmesine rağmen, 1960 öncesi hastalık ile ilgili literatür yok denebilecek kadar azdır.

1800'lü yılların başlarından itibaren literatürde NEK'e benzer olgular tanımlanmış olmasına rağmen bunların önemli bir kısmının NEK olup olmadığı kuşkuludur^{4,19}. NEK'le ilgili ilk yayınlar 1888 ve 1891 yıllarında Paltauf ve Generisch tarafından rapor edilmiştir. Bu hastalığa nekrotizan enterokolit adı ilk kez 1953'de Schmid ve Quasier tarafından verilmiştir²⁰. Başarılı tedavi ilk olarak 1943 yılında, lokalize NEK'li bir yenidoğanda gelişen distansiyona bağlı ileal perforasyona primer sütür konularak gerçekleştirildi^{21,2}.

3.1.2. İNSİDANS

NEK'li hastaların görülme sıklığını tahmin etmek zordur. Bu durum, bölgelere göre farklılıklar olması, kurumlardaki kayıtların güvenilirliği ve kayıt dışı doğumlara bağlıdır²⁰. ABD'de NEK insidansı 1000 canlı doğumda 1–3, yenidoğan yoğun bakım ünitelerine yatan yenidoğanlarda da % 0,8- 8, (ortalama % 2–4) oranında görülür ve her yıl 3000–5000 yenidoğan etkilenir^{4,20}.

Çok düşük doğum ağırlıklı (ÇDDA) (<1500 gr) yenidoğanların bazı ülkelerdeki NEK insidansları: Japonyada % 1–2, Avusturya'da % 7, Yunanistan'da % 10, Arjantin'de % 14 ve Hong Kong'da % 28 olarak bildirilmiştir⁴.

Kızlarda ve erkeklerde aynı oranda görülür. Irk ve sosyoekonomi arasındaki farklılığın, NEK'in görülme sıklığı üzerine etkisi gösterilememiştir. NEK yenidoğanların % 90'nından fazlası 2000, % 48-58'i 1500 gr altındadır. Vücut ağırlığı 1500 gramın altında olan bebeklerde NEK görülme sıklığı daha yüksektir (% 10- 15)²².

3.1.3. EPİDEMİYOLOJİ VE PATOGENEZ

Çok sayıdaki klinik ve deneysel çalışmaya rağmen NEK'in etyopatogenezi tam olarak açıklanamamakla beraber suçlanan bazı faktörler şunlardır:

3.1.3.1. GESTASYONEL YAŞ VE DÜŞÜK DOĞUM AĞIRLIĞI

NEK gelişimi doğum ağırlığı ile ters orantılıdır. Savunulan diğer görüş ise gestasyonel yaşın düşük doğum ağırlığından daha önemli olduğudur. Ortalama 33,4 haftadan daha önce

doğanlar NEK gelişimi açısından yüksek riske sahiptir ²³. Gestasyonel yaş 35–36 haftayı geçince NEK görülme riskinde belirgin bir azalma görülmektedir.

ÇDDA bebekler ve 28 haftadan önce doğan bebekler NEK'e en duyarlı gruplardır ¹⁴. Erken doğan infantlar, mukozal defansın iyi gelişmemiş olması, barsağın anormal bakteri kolonizasyonu, aşırı inflamatuvar cevap, intestinal kan akımının anormal düzenlenmesi ve peristaltizmin azalması gibi bazı faktörler NEK'in oluşmasında en önemli risk faktörleri olarak kabul edilmiştir ²⁴. Preterm bebeklerde barsak immun sisteminin iyi gelişmemiş olması barsak bakterilerine karşı direnci azaltmaktadır. İmmatür barsakta IgA sekresyonunun az olduğu gösterilmiştir ²⁵.

Kliegman ve Fanaroff ¹² çalışmalarında düşük doğum ağırlığının NEK patogenezinde önemli rol oynadığını göstermişlerdir. Ortalama 31 haftalık (ortalama doğum ağırlığı 1460 gr) 123 yenidoğan üzerinde yapılan bir çalışmada % 7,3 ve % 10,5 oranında NEK bildirilmiştir.

2001'de Uluslar Arası ocuk Sağlığı ve İnsan Gelişimi Enstitüsünün (NICHD) tarafından 14 yenidoğan merkezinde yapılan çalışmada 401 gr ile 1500 gr arasındaki ÇDDA larda NEK insidansı % 7 iken, 501 ile 600 gr arasındaki ÇDDA yenidoğanlarda ise % 15'e yükselmektedir ²⁶.

3.1.3.2. BESLENME

İnfantların yaklaşık % 90 nında NEK oral beslenmeden sonra gelişirken, yalnızca % 10 'undan azında ise oral beslenme öncesi görülmektedir ². Prematür bebeklerde, özellikle beslenmeyi çok arttırmanın NEK patogenezinde rol aldığı sylensede yapılan çalışmalarda hızlı veya yavaş beslenme uygulamaları arasında risk açısından herhangi bir fark görülmemiştir ².

NEK gelişen bebeklerin % 90–95'i ticari mamalarla beslenmiştir. Buna karşılık prematüre bebeklerde oral beslenmeyi geciktirerek veya volümü azaltarak NEK'i önlemeye

yönelik çalışmalar hastalığın insidansını düşürmede tartışmalı sonuçlar vermiştir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar göstermiştir ki anne sütü tüm enfeksiyonlar ve NEK için koruyucu role sahiptir^{27,28}.

Anne sütü bebekleri alt solunum yolu enfeksiyonları, ortak kulak iltihabı, menenjit ve bakteriyemiden olduğu kadar NEK'ten de koruyan en önemli etken gibi görünmektedir²⁹. Anne sütü içerdiği salgısal IgA, IgG, IgM ve lizozim gibi etkenlerle pasif bağışıklık oluşturur³³. İlk günlerde içerdiği IgG düzeylerinin düşük olmasına rağmen, yüksek konsantrasyonlardaki IgA, yenidoğanın GİS'ini patolojik ajanlara karşı korur^{4,30}. Anne sütündeki lizozimin, birçok mikroorganizmayı lizise uğrattığı in vitro olarak gösterilmiştir. Laktoferrin de, lümen içindeki serbest demiri bağlayarak bakterilerin kolonizasyonu için gerekli olan ortamın oluşumunu önler. Anne sütü, içerdiği bifidus faktörün etkisiyle gram (+) anaerobik bir bakteri olan *Lactobacillus bifidus*'un çoğalmasını sağlayarak patojen mikroorganizmaların yerleşmesine engel olur³¹. *Lactobacillus bifidus* normal beslenen bebeklerin sindirim sisteminde önde gelen bakteriyken, prematür ve formüle mamalarla beslenen bebeklerde NEK insidansı yüksektir³¹.

Formüle mamalarla beslenen prematürlerde NEK insidansı anne sütüyle beslenenlere nazaran 6–20 kez daha yüksektir. Ancak NEK'li bebeklerin % 6–10 'u enteral beslenmeyen ve parenteral yoldan beslenen bebeklerdir⁴.

Yenidoğanlarda görülen karbonhidrat emilim bozukluğu, enterik bakterilerin etkisi ile karbonhidratları fermantasyona uğratarak yağ asitlerine dönüştürür. Normal fizyolojik koşullarda, bu yağ asitleri bikarbonata dönüştürülerek lümen içi PH'nın 7 civarında tutulması sağlanır. Bu mekanizmadaki bozukluk, PH'nın 5'in altına düşmesine ve bakteriyel invazyonu kolaylaştıran mukoza hasarına neden olur. Fermantasyon sırasında hidrojen gazı oluşur ve bunun barsak katmanlarına yayılmasıyla pnömatozis intestinalis tablosu gelişir. Mama ile beslenmeyen, ancak NEK gelişen hastalarda bu tablonun gözlenmediği ileri sürülmektedir^{12,2}

3.1.3.3 İNFEKSİYON AJANLARI

Normal şartlarda bir yenidoğanda GİS'in fizyolojik florası yaşamın ilk on gününde gelişir. Doğum kanalında geçerken daha önce bakterilerle temas etmemiş olan bebek, doğumla birlikte hızlı bir şekilde kontamine olur. Bu süre, GİS için ortalama 24 saattir. Prematür doğanlar başta olmak üzere yenidoğanlarda, bağışıklık sisteminin zayıflığına ve mide asidi ile barsaklardaki IgA seviyesinin azlığına bağlı olarak, barsaklarda hızlı ve dengesiz bir kolonizasyon meydana gelmektedir^{32,33}.

NEK'in etyopatogenezinde en önemli hatta primer rolü, bakteriler ve virüsler gibi enfeksiyon ajanları ve hipertonic beslenmenin aldığı ileri sürülmüştür⁴. Enfeksiyonun etyolojisinde şu faktörler rol oynamaktadır:

1-NEK, zaman zaman belli bölgelerde, aynı enfeksiyon ajanının izole edildiği epidemiler şeklinde görülebilmektedir. NEK'li infantlarda yapılan bir araştırmada hastaların kan, gayta ve BOS kültürlerinde önemli oranda ECHO virüs Tip-22, E. coli, Klebsiella gibi birçok mikroorganizma üremiştir^{2,4,34,35,36}.

2-Rezeke edilen barsak segmentinde aşırı bakteriyel proliferasyon dikkati çekmektedir³⁷.

3-Clostridial türlerle NEK arasında ilişki. Clostridium türlerinin oral alınmasından sonra NEK benzeri bir hastalık oluşumu³⁸.

4- NEK gelişimi, bilinen risk faktörü taşımayan bebeklerde de görülebilmektedir⁴.

5- Bakteriyal fermantasyon sonucu hidrojen gazı meydana gelir. Pnömatosis intestinalis görünümü bu gazın göstergesidir².

6-Antibiyotiklere cevap alınması.

7-Yenidoğan döneminden sonra da NEK görülebilmesi, hipovolemi, hipoksi, hipertonic beslenme ve GİS immatürite teorilerini boşlukta bırakmaktadır⁴.

8- Deneysel olarak endotoksinin verilmesi ile NEK'e benzer lezyonlar oluşması. Endotoksinler TNF- α ve PAF salınımına aracılık eder. NEK'li prematüre infantların

serumunda TNF- α , PAF ve IL-6 seviyeleri yüksektir. Endotoksin NEK'li olgulardan kan kültüründe gram (-) bakteri üreyen olguların % 80 inde, NEK'li olguların ise yaklaşık % 50' sinde tespit edilmiştir^{39,2}.

NEK'in primer bakteriyolojik kültürleri, BOS, kan, gayta ve peritonel kavitelerinden elde edilebilmektedir. Hastaların % 30-35'inde kan kültürlerinde tespit edilmiştir. En sık karşılaşılan mikroorganizmalar E.coli ve Klebsiella pneumonia'dır. Bu ikisi dışında Proteus mirabilis, S. aureus, S. epidermidis, Salmonella Enterococci, Clostridium perfringens ve pseudomonas aeruginosa şujları da kan, gayta ve periton kültürlerinden elde edilen mikroorganizmalardır. Clostridium şujları anaerob bakteriler olduklarından, iskemik dokularda kolaylıkla çoğalabilmekte, dokuyu istila ederek, gaz ve toksin üretilip sıklıkla ölümcül seyreden fulminan hastalıklara neden olabilmektedir. Nadiren Rotavirus, Coronavirus, Coxsackie B2 ve enterovirus gibi viral ajanlar da NEK'li hastaların barsaklarından izole edilmiştir. Olguların % 10'unda candida cinsi mikroorganizmalar izole edilmiştir^{2,4}.

3.1.3.4. FARMAKOLOJİK AJANLAR

Prematürlerin apne tedavisinde kullanılan ve prenatal dönemde kullanılan ksantin türevleri (teofilin, aminofilin) ürik asit metabolizması ile ilişkili olarak toksik olan serbest oksijen radikallerinin üretimine neden olarak mukozal hasara yol açmakta ve aynı zamanda barsak motilitesini yavaşlatarak NEK insidansında artış göstermektedirler^{40,2}. Ancak prematürlerde apne tedavisinde kullanılan İV ksantin türevlerinin NEK'e yol açmadığını bildiren raporlar da vardır^{41,42}.

Yine yenidoğanlarda, retinopati gelişimini önlemek amacıyla oral kullanılan Vit E, hipokalsemiyi önlemek için kullanılan oral kalsiyum laktat ve mekonyum ileusun tedavisinde kullanılan hiperosmolar kontrast maddelerle ortaya çıkmış NEK olguları rapor edilmiştir^{4,43}.

Patent Duktus Arteriosus'un kapatılmasında kullanılan İndometazin, Prostaglandin

sentezini bloke eder ve vazokonstrüksiyona neden olur, Bu ilacın düşük doğum ağırlıklı infantlarda GİS perforasyonlarına ve NEK'e neden olduğu görülmüştür. İndometazin mezenterik vasküler rezistansı arttırır ve mezenterik kan akımını (% 16–20) azaltır. İntrauterin girişimlerden sonra tokolitik olarak kullanılan İndometazin, NEK insidansını arttırmaktadır. Ancak İndometazinin 32 haftadan erken doğan ve çok düşük doğum ağırlıklı bebeklere verildiğinde, NEK için bir risk faktörü olduğu söylenebilir^{2,4,44}.

Son yıllarda kullanımı artan kokain gibi opioidlerin preterm kullanımı sonucu GİS'te vazokonstrüksiyon yaparak NEK gelişimine neden olabileceği bildirilmiştir. Bu hastaların klinik semptomları daha kısa sürede ortaya çıkmakta ve hastalık daha hızlı ve ölümcül seyretmektedir. Yine kokain kullanan annelerin aynı zamanda alkol, sigara, başka uyuşurucu kullanmaları da NEK'ı etkilemektedir^{2,4}. Özkan ve ark.⁴⁵ tarafından yapılan çalışmada prenatal dönemde maternal nikotine maruz kalmış fetusların barsaklarında önemli derecede harabiyet saptanmıştır.

3.1.3.5. YENİDOĞANLARDA BARSAK BARIYERİ

Preterm GİS, hücrel ve hümoral immunité immatüritesi, permeabilite artması, gastrik asit sekresyonunun azalması, proteolitik enzim konsantrasyonunun azalması, motilite azalması, intestinal epitelyum ve villus immatüritesi ile karakterizedir. Bunlara bağılı olarak bozulmuş barsak bariyeri NEK oluşumunda önemli bir faktördür. Bu bariyer lümendeki bakterilerin sisteme ulaşmasını engelleyecek karmaşık anatomik ve fonksiyonel özelliklere sahiptir. GİS bariyerinin elemanları spesifik ve non-spesifik komponentler şeklinde incelenebilir. Non-spesifik elemanlar mide asiti, pepsin, pankreatik enzimler, mukus, barsak motilitesi, spesifik elemanı da immünglobülinlerdir. Bakterileri öldüren gastrik asit ve pepsinin sekresyon seviyeleri ilk 4 haftada düşüktür. Pankreas enzimleri de ilk bir yıl içerisinde rölaf olarak az salgılanır. İmmatür barsak goblet hücrelerinden de az miktarda mukus salgılanır. Mukoza hücreleri az gelişmiştir ve fonksiyonlarını yürütmek için

yetersizdir^{2,3}.

Prenatal dönemin sonlarına doğru peristaltik hareketler başlar ancak 8. aya kadar tam olarak gelişim olmaz. Koruyucu Ig'ler ve özellikle IgA prematür barsakta yetersizdir. Bebek anne sütüyle beslenmiyorsa, anne sütünde bulunan sekretuar IgA, oligosakkarid, laktoferrin, lizozim, epidermal growth faktör ve immün hücrelerden yararlanamaz^{2,4,46}.

Bu barsak bariyerlerinin bozulması ile NEK oluştuğunu destekleyen bulgular: Respiratuar Distres Sendromu (RDS) nedeni ile verilen kortikosteroidlerin, GİS mukozal hücrelerinin olgunlaşmasını ve barsak bariyer fonksiyonunu düzenleyerek NEK'ı azalttığı, anne sütünün mukozal bariyerleri güçlendirdiği, oral IgG-A verilmesinin NEK insidansında belirgin azalma yaptığı gösterilmiştir^{4,5,6}.

Sonuç olarak NEK'ın etyopatogenezinde birden fazla etken rol oynamaktadır. Santulli bu etkenleri üç ana başlık altında toplamıştır. 1) Barsak zedelenmesine esas olarak iskemik travma. 2) Bakteriyel kolonizasyon. 3) Barsak lümeninde bir substratın varlığı (mama)⁷.

MUKOZAL BARIYERİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Hipoksi: Hipoksik durumlarda hayatın devamlılığı için hayati organlar korunur. Bu durumlarda hayati organları korumak için kan sindirim organları ve periferdeki organlardan çok kalp, beyin ve böbrek gibi organlara gider. Bu mekanizma dalma (diving) refleksi olarak tanımlanır. Bir süre tolere edilebilen bu durum uzayacak olursa barsaklarda dolaşımın yavaşlamasına bağlı olarak kalıcı iskemik hasar meydana gelir⁴.

Umbilikal Ven Kateteriyle Exchange Transfüzyon: Bu işlemten sonra % 1–2 NEK gelişimi rapor edilmiştir. Kateterin ucu umbilikal ven ve duktus venozus veya portal ven ayırımına yerleşir. Exchange transfüzyonun injeksiyon fazında bu bölgeye kateterden olan akım sonucu ven basıncı anlamlı şekilde artar ve venöz konjesyon sonucu barsakta arteriyel akım azalır⁴⁷.

Umbilikal Arter Kateterizasyonu: NEK gelişen bebeklerde % 25–45 arasında değişen sıklıkta umbilikal arter kateterizasyonu yapıldığı gösterilmiştir⁴⁸. Bu bebeklerde

kateterizasyona bağlı mezenterik tromboembolizm ile NEK arasında bir etyolojik ilişki olabileceği öne sürölmüştür ⁴⁹. Eğer beslenmeye bağlı barsakta büyük metabolik ihtiyaç varsa, beslenme ve multipl tromboemboli kombinasyonu intestinal nekroz ve NEK'e yol açabilir. Pratikte bunu kanıtlayacak kontrollü bir çalışma yoktur ⁴⁹.

Kardiovasköler Hastalıklar: Supraventriköler taşikardi tedavisine alınan bebeklerde NEK insidansı belirgin şekilde artmıştır. Yine kardiyak anomalileri tespit amacıyla yapılan kardiyak kateterizasyon ve kardiyovasköler anomalilere bağlı azalmış kardiyak output mezenterik kan akımında azalmaya neden olabilir ^{50,51}.

Hiperviskozite: Viskozite bir sıvı tabakası diğer bir tabaka üzerinde hareket ettiğinde oluşan iç sürtünmenin bir ölçüsüdür. Kanın viskozitesinin ana belirleyicisi hematokrittir. Kan nonnewtonian bir sıvı olduğundan Hct % 62'nin üzerine çıkınca viskozite özellikle artar. Yenidoğanda polisitemi % 65 ve üzeri hematokrit ile karakterizedir. Fakat kan pH'sı, vücut ısısı ve protein konsantrasyonuna bağlı olarak daha düşük değerlerde de vizkozite artışı meydana gelebilir. Hiperviskozite yenidoğan dönemde daha sık görülür ve mikro dolaşımda azalmaya yol açar. İntestinal kan akımının azalmasıyla NEK'in etyolojisinde önemli bir faktör olabilir. Yapılan çalışmalarda bunu destekleyen bulgular mevcuttur ⁴⁹. 1500 gr dan düşük ağırlıklı, ağır NEK'li bebeklerde polisitemi insidansı % 28, kontrol grubunda ise % 10 olarak bildirilmiştir ⁵².

İskemi reperfüzyon hasarı: İskemik dokuda reperfüzyon sonrası ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri hücresel yapılara son derece toksiktir. Hücre zarı, lizozom ve mitokondri gibi hücre yapılarını tahrip eder. Kısa süreli iskemiye takip eden reperfüzyon durumunda bile mukoza bariyeri değişebilmekte, öyle ki mukozal permeabilite belirgin şekilde artmaktadır. Bu artışa başta serbest oksijen radikalleri olmak üzere, eikosanoidler, Prostaglandin-E2 ve nötrofiller yol acar ⁵³.

Son yapılan çalışmalarda distansiyonun, barsak duvar kan akımını azaltarak, beslenmesini bozduğu için NEK gelişimi ve prognozunu kötü yönde etkilediği tespit edilmiştir ⁵⁴.

3.1.4. PATOLOJİ

NEK, intestinal mukozada koagulasyon nekrozu, inflamasyon ve hemoraji görülen ve vakaların yaklaşık % 10'unda fokal nekrotik psödomembranöz formasyon ile karakterize patolojik değişikliklerle tarif edilir⁴⁸. En sık olarak etkilenen bölüm sıra ile terminal ileum, çıkan kolon ve transvers kolondur. İnen kolon ve nadir olarak mide ve ince barsakların büyük kısmı da etkilenebilir³⁷.

Çok şiddetli vakalarda ödem, mukozal ülserasyonlar ve hemoraji mevcut olup serozal yüzeyde tutulabilir. Vakaların çoğunda pnömatozis intestinalis vardır ve genellikle submukoza ile sınırlı olup, sıklıkla mezenter içine yayılır. Hasta dikkatli olarak değerlendirildiğinde transmural infarkt vardır. Genellikle antimezenterik yüzeyde oluşur ve perforasyon meydana gelir. Yaygın peritonit, lokal abse, kitle formasyonları görülür. NEK tek veya çok segmentli tutulum şeklinde olabilir. Olguların % 44'ünde hem ince hem de kalın barsaklar, % 26'sında sadece kolon ve % 30'unda da sadece ince barsaklar hastalığa katılmaktadır. Fulminan NEK (pannekroz) olarak tanımlanan klinik tabloda ise sindirim sisteminin en az % 75' inde nekroz ile karakterize tutulum mevcuttur^{2,37}.

En sık mikroskopik bulgusu barsak mukozasında orta düzeyde yüzeyel koagulasyon nekrozu (% 89) dur. Aynı zamanda mukozada ödem, inflamasyon ve hemorajiden tam kat nekroza kadar değişen geniş bir histopatolojik spektrumu vardır^{2,55}. İnflamatuvar hücre reaksiyonu başlangıçta azdır. İnflamasyon geç bulgu olarak karşımıza çıkar. Ancak derecesi klinik tablonun ciddiyetine göre değişir. Lenfositler, plazma hücreleri, nötrofiller, histiositler ve eozinofiller görülebilir. Barsak mukozasının yüzeyel nekrozunda genellikle intestinal bakteriler görülebilir. Geniş bir serideki vakaların % 3,5'inde fungal üreme görüldüğü bildirilmiştir^{2,48}.

NEK'in histolojik bulguları erişkin ve çocuklardaki iskemik barsak hastalıklarına benzemektedir. NEK'te kabul edilen teoriler, primer olarak iskemi olup, sekonder olarak da

barsak florasının etkisidir ⁴⁸.

Trombüs submukozal mezenterik damarlar ve arteriollerde nadir olarak görülebilir. Ancak trombüslerin hastalık süreci içinde ortaya çıkan ikincil değişiklikler olduğu düşünülmektedir ².

NEK, üçüncü günden itibaren hızlı bir epitelizasyonla iyileşmeye başlar. Fibroblastik proliferasyon 8. 9. günlerde belirginleşir, iyileşme submukozal fibrozis sonucu striktürle sonuçlanabilir. Nekroz nedeniyle belirgin doku kaybı olduğunda tamir olayı çoğunlukla fibrozisle sonuçlanır ve kas tabakasının tutulduğu ciddi olgularda lümenin darlığıyla sonuçlanır ³.

3.2. NEK VE İMMÜNGLOBÜLİNLER

İmmünglobülinler humoral immün cevap sonucu elde edilen protein yapısında moleküllerdir. Antikor özelliği taşır ve plazma hücreleri tarafından sentezlenir. Ancak immünglobülinlerin tümü antikor değildir. Total plazma proteinlerinin % 20'sini immünglobülinler oluşturur ^{56,57}.

Bir antikor molekülü birbirine eş iki ağır (H) ve iki hafif (L) zinciri olan ve her bir zinciri bir değişken (V) bir sabit (C) bölge içeren dört polipeptit zincirinden oluşur. Dört zincir Y biçimli bir molekülü oluşturacak şekilde bir araya gelir. Her hafif zincir bir ağır zincire, her iki ağır zincir de birbirlerine disülfid bağlarıyla bağlıdır. Bir hafif zincir bir V ve bir C bölgesi taşır. Her bir bölge büküm immünglobülin bölgesi diye adlandırılan karakteristik üç boyutlu bir yapıyı oluşturacak şekilde katlanırlar. Ig bölgeleri, immün sistemde veya immün sistem dışında kalan pekçok proteinde de vardır. Bu proteinlerin çoğu çevresel ve diğer hücrelerden gelen sinyalleri algılamada görev yapan proteinlerdir ⁵⁸.

İmmünglobülinler ilk olarak papain ile parçalanmış ve IgG molekülü üçe ayrılabilmiştir. Elden edilen parçalardan ikisinin eş molekül ağırlığında ve aynı zamanda antijen bağlama yeteneğinde olduğu saptanmıştır. Bu parçalara Fab ismi verilmiştir. Buna

karşılık üçüncü parçanın kolaylıkla kristalize olabildiği görülmüş ve Fc olarak isimlendirilmiştir. İmmünglobülin molekülü, ağır ve hafif zicirinden oluşan Fab parçasında, antijenle spesifik olarak birleşir. Fc parçasında da nonspesifik olarak Fc reseptörü taşıyan hücrelere (nötrofil, makrofaj, mast hücreleri..) bağlanabilir, romatoid faktör ve komplemanı bağlayabilir ^{57,59}. Her IgG, IgD ve IgE antikor molekülü iki antijen bağlama bölgesine sahiptir. Salgılanan IgA bir dimerdir ve dört antijen bağlama bölgesine sahiptir. Salgılanan IgM bir pentamerdir ve 10 antijeni bağlama kapasitesi bulunmaktadır ⁵⁸.

İMMÜNGLOBÜLİNLERİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

IgA

IgA Peyzer plakların submukozası, tonsil ve submukozal lenfoid dokudaki B hücrelerinden üretilmektedir. Mol ağırlığı monomer için 160 kilodalton (kD), dimer için 400 kD olan, plazmada % 90 monomer formunda bulunan; vücut sekresyonlarında hemen tamamen dimer olarak bulunan bir immünglobülinidir. Çok az bir kısmı da polimer olarak bulunabilir. Plazmadaki total immünglobülinlerin % 10–15 kadarını IgA oluşturur. IgA'nın antijenik farklılık gösteren IgA1 ve IgA2 olmak üzere 2 alt sınıfı bulunduğu saptanmıştır. Plazmadaki IgA'nın % 90 kadarı IgA1, %10 kadarı da IgA2'dir. Ancak sekresyonlarda bu oran yarı yarıyadır ^{56,57,59}.

IgA antikorları hem dolaşımda, hem de dokularda bulunur. IgA, esas itibarıyla mukoza sekresyonlarının major immünglobülinidir ve bu nedenle sekresyon (mukus) ile örtülü dış yüzeylerde organizmanın lokal immun savunmasından sorumludur. Gözyaşı, tükürük, trakea, bronş, burun, vajen, barsak sekresyonları, safra ve sütte en yüksek düzeyde IgA bulunur. Bu kompartmanlarda IgM ve IgG düzeyleri hayli düşüktür. Barsak lümenindeki antikorları, esas itibarıyla spesifik IgA molekülleri oluşturur. IgA serumda çeşitli şekillerde bulunabilir. Monomer şekli en sık görülendir. Dimerik, trimerik ve hatta mültimerik şekiller görülebilir. Serum IgA globülini izoaglütininler, anti-brusella, anti-difteri, anti-insülin ve

poliomyelit antikoru gibi çok çeşitli antikorları içerir. Sekretuar IgA'nın anti-enfektif özelliği, genel olarak dimerik formda yer alır ve salgısal IgA serum IgA'sına kıyasla proteolitik enzimlere daha dayanıklıdır^{56,57,59}.

Dimerik ve polimerik IgA, başlıca gastrointestinal traktustaki lenfoid yapılar olmak üzere, muhtelif sekretuar dokularda submukozadaki plazma hücreleri tarafından yapılır. Monomerik IgA, lenfatik yolla genel dolaşıma giderken, dimerik IgA reseptörlerine bağlanarak, onunla birlikte, endositotik veziküller içinde hücre sitoplâzmasına geçerek karşı taraftaki membrandan sekrete edilir. Reseptör-IgA kompleksi epitel hücrelerini terk edince, reseptör proteolitik etki sonucu derhal parçalanır. Bunun S-S köprüleri ile IgA dimerine bağlı kalan küçük bir parçasına " sekretuar komponent" adı verilir. IgA reseptörünün yetersizliği halinde, plazma IgA düzeyi normal olduğu halde, sekresyonlardaki düzey düşük kalır. Ancak genelde, IgA'nın serum düzeyleri ile paralellik vardır^{56,57}.

IgA, komplemanı alternatif yoldan çok zayıf aktive edebilir, makrofaj ve nötrofillere zayıfça bağlanabilir. Fagositozu güçlendirmek için, bazı hallerde bakterileri, onlara zarar vermeksizin örterek, IgG ve IgM'nin güçlü antibakteriyel etkilerinden korunmalarına yol açabilirler. Sekretuar IgA'nın asıl etkinliği, mikroorganizmaların mukoza hücrelerine bağlanmalarını ve dolayısıyla onların dış yüzeylerde kolonize olmalarını veya epitelyum hücrelerini enfekte etmelerini önlemek suretiyle olur. IgA molekülleri ayrıca, barsağa besinlerle ulaşan ve absorbe edildikleri takdirde zararlı olabilecek makromoleküllerle birleşerek, absorbe olmayan kompleksler oluştururlar. Daha sonra bu kompleksler barsak yüzeyindeki enzimlerle kolayca tahrip edilirler ve böylece organizma bu zararlı yabancı antijenlerden korunmuş olur. Salgısal IgA'da ek olarak salgısal (Transport parçası) parça bulunmaktadır. Ayrıca IgA çeşitli mikroorganizmalar tarafından oluşturulan toksik veya litik enzimleri da nötralize edebilir^{57,59}.

IgG

Mol ağırlığı 150 kD olan bazik ünitten yapılmış monomerdir. Bu moleküller kanda dolaşan antikor moleküllerinin % 75'ini oluşturur. IgG1, IgG2, IgG3 ve IgG4 olmak üzere, antijenik farklılık gösteren 4 alt sınıf bulunduğu gösterilmiştir. Alt sınıflar arasındaki antijenik farklılıklar, disülfid bağlarının pozisyon ve sayısındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. IgG1 total IgG miktarının % 60-70'ini, IgG2 % 14-20'sini, IgG3 % 4- 8'ini ve IG4 %2-6'sını oluşturur^{56,57,59}.

IgG molekülü tripsin, papein ve pepsin ile protolitik olarak parçalanabilir. Papain ve tripsin molekülün ağır zincirini etkiler ve bir Fc parçası iki Fab parçası ortaya çıkar. Birçok hücre yüzeyinde IgG için Fc reseptörleri bulunduğu belirlenmiştir. Bu reseptörler aracılığı ile IgG molekülleri, immun kompleksin ve partiküler antijenlerin opsonizasyonunu güçlendirirler. IgG antikorları antiviral, antitoksik aktiviteye sahiptir, etkili birer opsonindirler ve işlev için komplemana gereksinimleri yoktur. IgG yarılanma süresi plazma proteinleri arasında en uzun olanıdır ve 23 gün kadardır⁵⁷.

IgG plasentadan geçebilen tek immünglobülinidir ve yenidoğanın ilk haftasında koruyucu etkilerini gösterir. İntrauterin yaşamda, anneden fetusa geçen IgG antikorları, doğumdan sonraki birkaç ay süresince, titreleri giderek azalmakla beraber, bebekte kalırlar. Plazmada bulunan IgG, ransüdasyon (sızma) ile eksternal sıvılara da geçebilir. Annenin emzirdiği ilk süttten (kolostrum), serumdan sızmış IgG, bebeğin barsak mukozasından geçerek doğumu izleyen ilk günlerde pasif bağışıklığı güçlendirir. IgG, beyin-omurilik sıvısına (BOS) enflamasyon durumunda bile, çok az miktarda geçebilir. IgG'nin enflamasyonda bile BOS'a geçişinin çok zayıf oluşu nedeniyle, ansefalit ve menenjitlerde pasif immünoterapinin yararı tartışmalıdır^{56,57}.

IgM

IgM, normal serum immünglobülinlerinin %10 unu oluşturur. İnsanda IgM'nin, IgM1

ve IgM2 olmak üzere iki alt sınıfı vardır. Molekül ağırlığı 900 kD kadar olan pentamerdir. J zinciri taşıyan polimerler oluşturarak poliimmünglobülin reseptörler aracılığı ile epitelyumal yüzeylere geçebilirler. Diğer antikorlar gibi, oligomerik bir proteindir; ya membrana bağlı olarak eksprese edilir veya sekrete edilen formlar şeklinde bulunur^{56,57}.

Organizmanın, herhangi bir antijen (enfeksiyöz etken) ile karşılaşması halinde, immun sistemin ilk sentezlediği ve dolayısıyla serumda önce beliren antikorlar IgM sınıfından antikorlardır. Bunlar aylar içinde kaybolarak yerlerini, uzun süre koruyucu etkinlik gösteren IgG sınıfı antikorlara bırakırlar. Bu nedenle serumda IgG'ye göre daha yüksek titrede spesifik IgM antikorlarının saptanması, akut bir enfeksiyona işaret eder^{56,57}.

IgM antikorları plasentayı geçemediğinden yenidoğanların gram negatif mikroorganizmalara karşı dirençleri düşüktür. Yenidoğanda, herhangi bir antijene karşı IgM antikorları bulunduğu gösterilirse bu, bebeğin o enfeksiyonu intrauterin dönemde aldığını (enfekte olduğunu) kanıtlar. IgM esas itibariyle plazmada bulunur. Ayrıca çok daha az sekretuar dokularda lokal olarak yapıldığı ve mukoza yüzeylerinde koruyucu işlev yaptığı bilinmektedir^{57,59}.

IgD

IgD, molekül ağırlığı yaklaşık 180 kD bir monomerdir. Plazmadaki immünglobülinlerin % 0,2–1 kadarını oluşturur. IgM ile birlikte B lenfosit yüzeyinde yer alır. IgD proteolitik enzimlere ve ısıya karşı dayanıklı değildir ve plasenta yolu ile anneden çocuğa geçmez. Asıl fonksiyonun ne olduğu iyi anlaşılamamıştır. Ancak bazı antijenlere (insülin, penisilin, süt proteinleri, difteri toksoidi, nükleer antijenler ve tiroid antijenleri) karşı antikor aktivitesi IgD tarafından sağlandığı ve immun sistemin gelişmesinde IgD nin rolü olduğu düşünülmektedir^{56,57,59}.

IgE

Molekül ağırlığı 190 kD olan bir monomerdir. Total serum immünglobülinlerinin %

0,004'ü IgE dir. Solunum ve sindirim mukozası IgE yapan hücrelerden zengindir ve bu mukozaların dış salgılarında IgE antikorlar bulunur. IgE sınıfı antikorlar mast hücrelerine ve bazofillere bağlanarak onları duyarlandırırlar. Allerjik hastalıkların major immünglobülinidir ^{56,57,59}.

Çocuklar, erişkindeki serum antikor düzeylerine IgM için 1. yaş içinde; IgG için 5–7. yaşlarda; IgA ve IgE için ise ancak pubertede ulaşmış olurlar. Yenidoğanda sekretuar (mukozal) IgA hemen hiç yoktur ve mukozalardaki etkin koruyucu düzeylere ancak 1 yaşında ulaşılabilir ⁵⁷.

3.3 MİYELOPEROKSİDAZ

Fagositoz; mikroorganizmalar, yabancı partiküller ve hücrel atıkların nötrofil ve makrofajlar gibi hücreler tarafından yutulmasıdır. Özellikle bakteriyel enfeksiyonlarda önemli bir defans mekanizmasıdır. Nötrofiller ve monositler bakterilerin öldürülmesi için hem oksijen bağımlı hem de oksijenden bağımsız mekanizmalar içerirler. Oksijen bağımlı mekanizmalar myeloperooksidaz sistemini ve oksijen türevi serbest radikallerin üretimini sağlayan bir başka sistem içerirler. Fagositoz olduktan sonra, lökosit hücre membranında yerleşmiş olan NADPH oksidaz sistemi çevre dokulardaki moleküler oksijeni süperoksit dönüştürür. Süperoksit oluşumuna eşlik eden moleküler oksijenin hızlı tüketimi, respiratuar patlama olarak adlandırılır. Daha sonra superoksit, superoksit dismutaz ile hidrojen peroksit dönüştürülür. Fagolizozomda bulunan lizozomal bir enzim olan MPO'nun varlığında peroksit ve klorür iyonları bakteriyi öldüren hipokloröz aside dönüştürülür. Fazla peroksit katalaz veya glutatyon peroksidaz ile nötralize edilir ⁶⁰.

MPO, başlıca nötrofil az miktarda da monosit ve makrofajlarda bulunan lizozomal bir enzimdir. MPO aktivitesi nötrofil sayısı ile doğru orantılı olarak artar. Doku MPO aktivitesinin ölçümü, inflamasyonun derecesini belirlemede iyi bir biyokimyasal parametredir

3.4. SİTOKİNLER

Bakteriyel hücre duvar ürünleri endotoksin olarak adlandırılır ve enfeksiyonlarda birçok patolojik role sahiptir. Endotoksin etkisini ortama salınan trombosit aktive edici faktor (PAF), TNF- α ve IL-6 gibi araçlar yoluyla göstermektedir. Bu sitokinlerin barsak nekrozunda da görev aldığı deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. Prematür infantlarda enteral beslenme sonucu gaytada endotoksin yapımının arttığı ve buna bağlı spontan endotoksemi gelişebileceği gösterilmiştir^{2,4,62,63}.

Deneysel çalışmalarda PAF verilmesiyle barsaklarda histolojik açıdan NEK'e benzer bir durum ortaya çıkmıştır⁴. PAF vazokontroksiyon yaparak kapiller kaçağı ve mukozal geçirgenliği artırmakta ve bazı sekonder mediatörleri açığa çıkarmaktadır⁶⁴. Sitokinlerin hemodinamik olarak mı yoksa doğrudan doku hasarı ile mi etkili olduğu tam olarak açık değildir. Ancak NEK etyopatogenezinde önemli faktörlerden, perinatal hipoksi veya enfeksiyon sonucu " hafif bir mukoza hasarı" veya formüla mamalarla beslenme sonucu " bakteri çoğalması " olabilir^{55,65}.

Asetilhidrolaz PAF'ın yarı ömrünü sınırlandıran ve birkaç dakikaya indiren bir enzimdir. Bütün bebeklerde düşük miktarda bulunan bu enzim, NEK'li bebeklerde kontrol grubuna göre daha düşük düzeydedir. Normalde erişkinlerdeki enzim seviyesine ancak 6. haftadan sonra ulaşılmaktadır. Ticari mamalarda bu enzim yoktur. Anne sütünde mevcut olan PAF asetil hidroksilaz enzimi anne sütünün NEK'e karşı olan koruyuculuğunun bir kanıtıdır. Aynı koruyucu özellik bekletilmiş anne sütünde yoktur^{2,4}.

Sonuç olarak NEK oluşumu, hasara neden olan mekanizmalar (sitokinler, iskemi, inflamatuvar mediatörler) ile koruyucu mekanizmalar arasındaki dengeye bağlıdır. Eğer denge hasar yönüne kayarsa mukoza bariyerinde ciddi yıkım, bakteri girişi ile bir kısır döngü meydana gelir; şok, sepsis ve şiddetli NEK sonucu ölüm meydana gelir^{55,66}.

Sınıflandırma:

Sitokinlerin keşfedilmesinden bu yana sınıflandırılmaları oldukça zor olmuştur. Bununla birlikte sınıflandırılmalarında çok sayıda metod geliştirilmiştir. Örneğin; fonksiyonlarına göre ve fizikokimyasal yapılarına göre gruplandırma yapılabilir. Fonksiyonlarına göre sınıflandırma ⁶⁷:

1- Doğal İmmüneyi sağlayan sitokinler:

*Tip-1 IFN *TNF * IL-1 *IL-6 *Kemokinler

2- Lenfosit Aktivasyonu, Büyümesini ve Farklılaşmasını Düzenleyen Sitokinler:

*IL-2 *IL-4 *TGF-β

3- İnflamasyon Düzenleyen Sitokinler:

*IFN_γ *İnfotoksin *IL-5 *IL-10 *IL-12 *Migrasyon İnhibitör Faktör

4- Hematopoezisi Stimüle Eden Sitokinler:

* IL-3 *IL-7 *GM-CSF *M-CSF *G-CSF vs.

3.4.1. Tümör Nekrozis Faktör alfa (TNF-α): Konakçı hücrelerin gram (-) bakterilere karşı esas mediatörüdür. Diğer enfeksiyöz organizmalara karşı yanıtta da rol oynar. Farelerde yapılan çalışmalarda varılan sonuca göre düşük konsantrasyonda LPS (lipopolisakkarit), mononükleer fagositlerin işlevini uyarır. Yüksek konsantrasyonlarda ise doku yaralanmasına bağlı yaygın intravasküler koagülasyona ve genellikle ölümlü sonuçlanan şoka neden olur ^{68,69,70}.

TNF'nin hücreyel kaynağı LPS ile aktive olan mononükleer fagositlerdir. Aktive natural killer (NK) hücreleri ve aktive mast hücreleri de bu proteini salgılar. İnsan TNF'si nonglikoz ile transmembran bir protein olup molekül ağırlığı 17 kD'dur. İki tip TNF vardır:

a) TNF- α (kaşektin)

b) TNF-β (lenfotoksin)

TNF düşük konsantrasyonlarda (yaklaşık 10^{-9} M'da) lökosit ve endotel hücreleri için

lokal olarak parakrin ve otokrin düzenleyicidir. Düşük yoğunluklarda biyolojik etkileri şunlardır.

- 1) TNF lökositlere karşı endotel hücre yüzeyini daha yapışkan hale getirerek damar endotel hücrelerinin yeni yüzeyel reseptörlerini eksprese etmelerine neden olur. TNF aynı zamanda nötrofillere de etki ederek endotel hücrelerinin yapışkan özelliklerini arttırır.
- 2) TNF inflamatuvar lökositleri, mikroorganizmaları öldürecek şekilde aktive eder. Özellikle nötrofilleri aktive etmede güçlüdür.
- 3) TNF; IL-1, IL-6, kemokinler ve mononükleer fagositleri uyarır.
- 4) Virüslere karşı IFN benzeri koruyucu etki gösterir.

TNF'nin enfeksiyonlara karşı temel sistemik etkileri aşağıdaki gibidir:

- 1) Endojen pirojen olarak etki ederek ateşi yükseltir. Bu etkiyi IL-1 ile yapar. Ateşin TNF ve IL-1'e yanıt olarak yükselmesi sitokinle uyarılmış hipotalamus hücreleri tarafından arttırılan prostoglandin senteziyle olur.
- 2) Mononükleer fagositlere ve vasküler endotel hücrelere etki ederek IL-1 ve IL-6'nın dolaşıma salınmasını uyarır.
- 3) Hepatositlere etki ederek serum amiloid A ve P protein, kompleman faktör 3, haptoglobulin, CRP, α 1-asit glikoprotein, Faktör B gibi bazı akut faz proteinlerin sentezini arttırır.
- 4) Damar endotelinin prokoagulan ve antikoagulan aktivitelerindeki dengeleri değiştirerek pıhtılaşma sistemini aktive eder.
- 5) Kemik iliğini baskılayarak ana hücre bölünmesini engeller. Sürekli TNF verilmesi lenfopeniye ve immün yetmezliğe neden olur.
- 6) TNF uzun süre deney hayvanlarına verildiğinde kaşektik metabolik değişmelere neden olur.

7) Gram (-) bakteriyel sepsis durumlarında çok yüksek miktarda TNF üretilir ve serum TNF konsantrasyonu artar.

TNF'nin birçok özel etkileri aşırı yüksek konsantrasyonlarındaki letal (öldürücü) etkilerine katkıda bulunur:

- 1) TNF myokard kasılabilirliğini azaltarak doku perfüzyonunu azaltır.
- 2) Damar düz kaslarını gevşeterek kan basıncını ve doku perfüzyonunu azaltır.
- 3) Ağır metabolik bozukluklara neden olabilir.

TNF'nin birçok fizyolojik etkisi IFN- γ tarafından arttırılır. Bu etki TNF'nin hedef hücrelerinde TNF reseptör sayısının IFN- γ ile uyarılarak arttırılmasına bağlı olabilir ^{68,69,70}.

3.4.2. Interlökin 6 (IL-6): Önceleri INF β 2 olarak isimlendirilen IL-6 yaklaşık 26 kD'luk bir sitokin olup T lenfosit, B lenfosit, monosit damar endotel hücreleri, fibroblastlar ve epitel hücreler, mast hücreleri tarafından sentez edilirler ^{71,72}. Diğer sinonimleri ise sitotoksik T hücresi farklılaşma faktörü, hybridoma/plazmositoma büyüme faktörü, trombopoietin'dir. 4 α helikal uzun zincirli sitokin ailesine ait olduğu kabul edilmektedir.

Sentez ve salgılanması:

IL-6'nın en iyi tanımlanan etkileri hepatositler ve B lenfositler üzerinedir:

- 1) IL-6 fibrinojen, hemopeksin, sistein proteinaz inhibitör, α 1 antikimotripsin, α 2 makroglobulin gibi akut faz cevaba katkıda bulunan birçok plazma proteininin hepatositler tarafından sentezine neden olur.
- 2) IL-6 B hücrelerinin immünglobülin salınımı için kofaktör olarak rol oynar. Malign plazma hücreleri için (Plazmositoma ya da myeloma) büyüme hücresi rolü oynar ve kendi kendine büyüyen plazmositom hücreleri otokrin büyüme faktörü olarak IL-6'yı salgılar.
- 3) Bir endojen pirojendir. TNF, IL-1, trombosit gelişme faktörü, antijenler ve bakteriyel endotoksinleri etkilemektedir.
- 4) Endotel hücrelere lenfositlerin adezyonu arttırır. Bu etkiyi intersellüler adezyon molekül 1

(ICAM1), VCAM1 ve E- selektin gibi endotel adezyon moleküllerinin ekspresyonlarını artırarak yapar.

5) IL-6 hipofizden ACTH salgısını indükler ve doğrudan glukokortikoid salgılamak üzere adrenalin uyarılmasını sağlar.

6) Böbreklerde mesengial proliferasyonu artırır.

7) Keratinositlerde proliferasyona, IL-1 ve TNF- α sekresyonuna neden olur.

Prematür infantlarda enteral beslenme sonucu gaytada endotoksin yapımının arttığı ve buna bağlı spontan endotoksemi gelişebileceği gösterilmiştir ⁷³. Endotokseminin kapiller permeabilitede artış, hipotansiyon, nötrofil agregasyonu, trombosit agregasyonu, pulmoner hipertansiyon, bronkokonstriksiyon gibi sistemik etkileri vardır. Hayvan deneylerinde endotoksemiye cevap bazı faktörlerle olmaktadır. Bunlar: PAF, TNF- α , IL-1 dir⁷⁴⁻⁷⁶. Bu sitokinlerin barsak nekrozunda da görev aldığı deneysel çalışmalarda gösterilmiştir ⁶³.

Sitokinlerin hemodinamik olarak mı, yoksa doğrudan doku hasarı ile mi etkili olduğu tam olarak açık değildir. NEK etyopatogenezinde önemli faktörlerden hipoksi ve bakteriyel invazyon ile sitokinlerin dolaşımında artması birbirine bağlıdır ⁷⁷. Hipoksi ve endotoksemi sinerjistik etkilidir. Hipotansiyon, hemokonsantrasyon, intestinal hipoperfüzyon ve buna bağlı oluşan intestinal hasar da birbirine katkıda bulunurlar.

Klinik olarak mama alan prematür infantlarda spontan olarak endotoksemi ve PAF seviyelerinin yükseldiği tespit edilmiştir. PAF'ın yarı ömrünü sınırlandıran, PAF'a spesifik bir enzim olan asetil hidrolaz yenidoğanlarda düşük seviyelerdedir ve NEK'li infantlarda kontrol grubuna göre aktivitesi daha düşüktür. Anne sütünde bu enzim bulunmaktadır ⁷⁸. PAF'ın mezenterik sirkülasyona verilmesi ile barsaklarda NEK'e benzer hasar olduğu gözlenmiştir ⁷⁹. Bunu takiben dozun artırılması barsak nekrozu ile sonuçlanmıştır. Endotoksine bağlı intestinal hasar PAF antagonisti verilerek engellenmiş bu sebeple hasarın PAF'a bağlı olduğu düşünülmüştür ⁸⁰. PAF'ın hipoksi ve metabolik asidoz da arttığı

bilinmektedir ⁸¹. Yenidoğanın asfiksida kalması NEK açısından risk oluşturmaktadır. Bu mekanizma da PAF'ın etyopatogeneizde rol aldığı görüşünü desteklemektedir.

3.5. APOPİTOZİS

Apopitozis, nekrozdaki ayırt edilmesi gereken farklı ve önemli bir ölüm şeklidir. Apopitozis nekrotik hücre ölümünde oluşan hücresel bir “intihar” yoludur. Apopitozis çok önemli fizyolojik ve patolojik olaylarda programlanmış hücre ölümünden sorumludur ⁸².

Bunlar;

- İmplantasyon, organogenezis ve gelişimsel involüsyonda olduğu gibi embriogenezis süresince hücrelerin programlanmış yıkımı
- Menstrüel siklus süresince endometriyumda veya süttten kestikten sonra memede olduğu gibi hormona bağımlı fizyolojik involusyonlar ya da kastrasyondan sonra prostatta olduğu gibi patolojik atrofi
- Barsak kripte epitelyumu gibi çoğalan hücrelerde hücre delesyonları veya tümörlerde hücre ölümü... vs

Gerçekten, hücrelerin fizyolojik apopitozise girmelerindeki yetersizlik aberan gelişme, tümör proliferasyonunun engellenmemesine veya otoimmün hastalıklara neden olabilir ⁸².

3.6. CD4

CD4, matür T hücrelerin aşağı yukarı % 60'ında, buna karşılık CD8, T hücrelerin % 30 kadarında ekspresse edilir; bu nedenle normal sağlıklı kişilerde CD4/CD8 oranı 2/1 kadardır. CD4 ve CD8 ekspresse eden hücreler (sırasıyla CD4+ ve CD8+ denilen) farklı fakat çakışan fonksiyonlar görür. CD4+ hücreleri ekseri “yardımcı”dır (helper). Çünkü, bunlar sonuçta immun sistemin tüm hücrelerini etkileyen solubl moleküller (sitokinler) salgılar. CD4+ yardımcı hücrelerin immunitedeki santral iyi, bu subtipin tahribinin sonucu şiddetle bozulduğu, insan immun yetmezlik virusu enfeksiyonu ile ortaya çıkar. CD8+ hücreler de sitokinler salgılar fakat bunlar virusla enfekte hücreleri veya tümör hücrelerini direk

öldürmede daha önemli rol oynar. CD4 ve CD8 koreseptörlerin oynadığı rol nedeniyle, CD4 yardımcı T hücreleri peptit antijenlere sadece klas II MHC bağlamında cevap verirken, CD8 sitotoksik hücreler sadece klas I MHC ile birlikte antijenlere cevap verir.

CD4 T hücreleri, ayrıca sitokin profilleriyle tayin edilen farklı fonksiyonlu, klinikle direkt ilgili subtipe alt gruba ayrılır. T_{H1} denilen (yardımcı T1) hücreler karakteristik olarak makrofaj ve tabii öldürücü (natural killer-NK) hücrelerin aktivasyonu dahil, direkt sellüler immun cevaplara yardım eden sitokinler salgılar. Bu T_{H1} sitokinler interlökin-2 (IL-2) ve interferon- γ 'yı (IFN- γ) içerir. Buna karşıt T_{H2} (yardımcı T2) CD4 hücreler, T_{H1} etkilerini antagonize eden ve/veya humoral immunitenin bazı yönlerini destekleyen sitokinler salgırlar⁸³.

4. MATERYAL VE METOD

4.1. Deneysel Çalışma

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde Deneysel Hayvanları Etik Kurulu'nun 12.05.2006 tarih ve 2006/19 sayılı kararı ile etik yönden uygun bulunarak yapıldı. Çalışma bütçesinin tamamı Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün 06102042 proje nolu kararı gereğince karşılanmıştır.

Normal şartlarda gebe kalan, gebelikleri normal seyreden ve gebelikleri sırasında hiçbir müdahale yapılmayan Sprague-Dawley cinsi ratların gebeliklerinin 20. gününde sağlık personeli gözetiminde matür doğum yapmaları sağlandı. Yenidoğan ratlar doğar doğmaz anne ratın yanından alınarak doğum ağırlıkları saptandı. Kontrol grubunu oluşturan yenidoğan ratlar tartıldıktan sonra anne ratın yanına bırakıldı. Çalışma gruplarını oluşturacak olan ratlar anne rattan ayrı olarak beslenme ve bakım sağlanmak üzere ortam ısısı 36 °C olan ve % 60 nem sağlayan özel inkübatöre yerleştirildi (Resim 1).



Resim 1: Özel rat inkübatörü.

4.2. NEK Oluşturma Modeli

Nadler ve ark.'nın tarif ettiği deneysel NEK modeli kullanıldı⁸⁴. Hiç anne sütü

almamış yenidoğan ratlar hiperozmolar formüla mama ile beslendi. Hiperozmolar formüla mama 75 ml. Pupy-milk canine milk replacement (Beaphar-bogena, B.V. Sedel, Nederland) içine 15 gr. Similac 60/40(Ross Pediatrics, Columbus, OH) karıştırılarak elde edildi. Bu karışım hiperozmolar olup protein ve kalori olarak rat anne sütüne benzemektedir²⁷.

4.3. Çalışma grupları

Yenidoğan ratlar her grupta 10 adet olmak üzere 4 gruba ayrıldı.

1. Grup (Kontrol Grubu-K): Bu grupta yer alan yenidoğan ratlar tartıldıktan sonra annesinin yanında bırakıldı. Anne sütünü emerek, 4 gün boyunca beslenmeleri sağlandı.

2. Grup (NEK Grubu-N): Bu gruptaki denekler doğar doğmaz, hiç anne sütü almadan annelerinin yanından alınarak 2 saatte bir (12 doz /24 saat) doyuncaya kadar özel damlalıkla 4 gün boyunca formula mama ile beslendi (Resim 2).

3. Grup (Sham Grubu-S): Doğar doğmaz tartılarak, hiç anne sütü almadan annelerinin yanından alındı, 2 saatte bir (12 kez /24 saat) doyuncaya kadar özel damlalıkla formula mama ile 4 gün boyunca beslendiler. 4 saatte bir (6 kez /24 saat) formula mama içine ilaveten 0.1ml /kg /gün İmmünglobülin çözücüsü olan distile su eklenerek verildi.

4. Grup(Tedavi Grubu-T): Doğar doğmaz tartılarak, hiç anne sütü almadan annelerinin yanından alınarak 2 saatte bir (12 kez /24 saat) doyuncaya kadar özel damlalıkla formula mama ile 4 gün boyunca beslendiler. Ayrıca 4 saatte bir (6 kez /24 saat) formula mama içine 600 mg /kg/gün İmmünglobülin A (insan kolostrumundan elde edilmiş, % 98 Ig A, Sigma) eklenerek 4 gün boyunca verildi.

Tüm gruplardaki ratlar 4. gün tartılarak, servikal dislokasyon ile öldürüldü. Steril şartlarda transvers laparotomi yapıldıktan sonra (Resim 3), barsakların ileoçekal valvinin 1 cm proksimalinden 2 cm. lik kısmı histopatolojik inceleme için, geri kalan yaklaşık 10 cm.lik kısmı da biyokimyasal inceleme için çıkarıldı (Resim 4). Çıkarılan barsaklar, içeriklerinin temizliği mikroskop altında serum fizyolojikle yapıldı (Resim 5). Mikroskopik inceleme için

ayrılan barsak dokusu % 10'luk formol içeren cam tüp içinde saklandı. Biyokimyasal incelemede kullanılacak dokular soğuk serum fizyolojik içeren cam tüplere alındı. Tüpler kodlanarak etiketlendi ve -80 C^0 deepfreeze de 4 gün saklandı.



Resim 2: Ratın özel damlalık kullanılarak formula mama ile beslenmesi.



Resim 3: Laparotomi sonrası ratın barsaklarının görünümü.



Resim 4: Rat barsağının ileoçekal valvi ve proksimal segmenti.



Resim 5: Rat barsak içeriklerinin mikroskop altında serum fizyolojik ile temizlenmesi.

4.4. Değerlendirme

Çalışmada, yavru ratların sağ kalım oranları ve ağırlık değişimleri, makroskopik olarak rat barsak duvarında inflamasyon ve nekroz görünümü, mikroskopik olarak barsak duvarında histopatolojik inceleme ve apopitozis skorlaması, biyokimyasal olarak barsak dokusu MPO, IL-6, TNF- α ve CD4 lmleri değerlendirme kriterleri olarak kullanıldı.

3.4.1. Histopatolojik alışma: Rat yavrularından alınan ince barsak dokuları % 10 formol ile fikse edildi. Uygun parçaların kesilmesinden sonra ototeknikon cihazından rutin takip yapıldı. Parafin içine gömülen dokular mikrotom aracılığı ile 5 mikron kalınlığında kesilerek lam üzerine alınarak, hemotoksilen eozin ile boyandı ⁸⁵. Ardında klasik ışık mikroskopunda (Nicon Eclipse- 200) incelendi. Morfolojik değerlendirme için, daha önce Caplan ve ark.³¹'nın kullandığı skorlama sistemi modifiye edildi ve barsaklardaki değişiklikler “0” dan “4” e kadar evrelendi ve Tablo 1’de gösterildi.

Tablo 1: Histopatolojik evrelemede kullanılan sınıflandırma

Evre 0: Normal barsak
Evre1A: Barsak villusunda hafif mukus zenginliği
Evre1B: Barsak villus epitelinde hafif dökülme
Evre2: Barsakta orta düzeyde villus hasarı
Evre3: Barsakta ciddi düzeyde villus hasarı
Evre4: Barsakta transmural nekroz

4.4.2 Apopitozis değerlendirilmesi: Rat yavrularından alınan ince barsak dokuları % 10 formol ile fikse edildi. Uygun parçaların kesilmesinden sonra ototeknikon cihazından rutin takip yapıldı. Parafin içine gömülen dokular mikrotom aracılığı ile 5 mikron kalınlığında kesilerek lam üzerine alındı. ARC (Apoptosis Repressor With CARD) Ab-1 Apopitozis kiti kullanılarak, immunohistokimyasal çalışma yapıldı. Tüm dokulara immunohistokimyasal çalışma ile Apopitozis boyamaları yapıldı. Skorlama Tablo 2’ de gösterildi ⁸⁶.

Tablo 2: Apoptozis skorlaması

Apoptozis hücresi	Skorlama
Negatif	0
% 0- 33 arası	+
%33- 66 arası	++
% 66 üstü	+++

4.4.3. Doku miyeloperoksidaz ölçümü: MPO aktivitesi, Grisham ve ark.'nın kullandığı metodun bir modifikasyonu kullanılarak ölçüldü ve Barley tarafında tanımlanan MPO ünitesi kullanıldı^{87,88}.

Barsaklar soğuk tuzlu suyla yıkandı ve soğuk potasyum fosfat tamponu ile (PH:7,4) Mikroson XL Ultrasonic CellDisruptor marka cihaz kullanılarak homojenize edildi. Homojenat 20 000 g de 20 dk 4 derecede santrifüj edildi. Geride kalan kısım, 3ml; 50 mM potasyum fosfat tamponu (PH:6,0), % 0,5 HETAB, 10 mM EDTA karışımı ile tekrar homojenize edildi. Daha sonra numune donduruldu, çözüldü ve ultrasonik homojenizatörde 15 saniye daha sese tabi tutuldu. 50µl homojenat alındı, üzerine 0,5 ml, 80 mM potasyum fosfat tamponu (PH:5,4) + % 0.5 HETAB + 1.6 mM TMB karışımı eklendi. Karışım 37 °C'ye getirildi. 10mM 50 µl H₂O₂ eklendi ve reaksiyon başlatıldı. 37 °C 3 dakika inkübe edildi. Reaksiyon 200 µl 20 µg/ml katalaz ve 2 ml 0,2 M sodyum asetat (PH:3,0) eklenerek bitirildi. Numuneler 3 dakikada bir kenarda buzun içine konarak bekletildi 655 nm'de absorbanslar Shimadzu UV-1601 marka spektrofotometre cihazı ile okundu. 1 ünite enzim aktivitesi, 37 °C 1 dakikada absorbansta 1 birim yükselmeye sebep olur. Bu bilgiye göre sonuçlar hesaplandı.

4.4.4. Doku IL-6 ve TNF-α ölçümü: Daha önce soğuk potasyum fosfat tamponu ile (PH: 7,4) homojenize edilen dokular 3000 rpm'de 10 dk. santrifüje edildi. Biosource rat IL-6 ve Biosource rat TNF-α ticari kit kullanılarak ELX- 800 cihazında, ELISA metod kullanarak IL-6 ve TNF-α seviyeleri ölçüldü.

4.4.5. Doku CD4 ölçümü: Dokular bir gece 56⁰C'lik etüvde bekletildi. Sonra; 30 dk. Ksilen, 15 dk absölü ve 15 dk. % 90'lük alkolde bekletildi. Bekleme işlevi sonunda EDTA buffer (10x) çözeltisine alınıp mikrodalgada 5'er dk olmak üzere 3 kere kuruldu. Sonra dokuların üzerin H₂O₂ damlatıldı 20 dk beklenildi, PBS içine alındı. 5 kez yıkandı, yıkamadan sonra 15' Ultra V blok damlatıldı. Distile su ile yıkandı. PBS (Fosfat Buffer Saline)'ne alındı 5'dk beklenildi. CD4 Ab-2 (Clone 1 F6) (Mouse anti-CD4) Neo markers kit kullanılarak preparatlar hazırlandı. Daha sonra mayer's hemotoksilen'le boyandı ve hazırlandı.

4.5. İstatistiksel Değerlendirme

Veriler kodlanarak bilgisayar ortamına aktarıldı. İstatistik analizi SPSS for Windows 10,0 paket programı yardımı ile yapıldı. Veriler ortalama \pm standart sapma ve % olarak özetlendi. Gruplar arası farklılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. Gruplar arası fark tespit edilen değişkenler ikincil test (Post Hoc Tukey HSD) testi ile değerlendirildi. Kategorik veriler Ki-kare (Chi- Square) testi ile değerlendirildi. Bağımlı gruplarda da Student t testi kullanıldı.

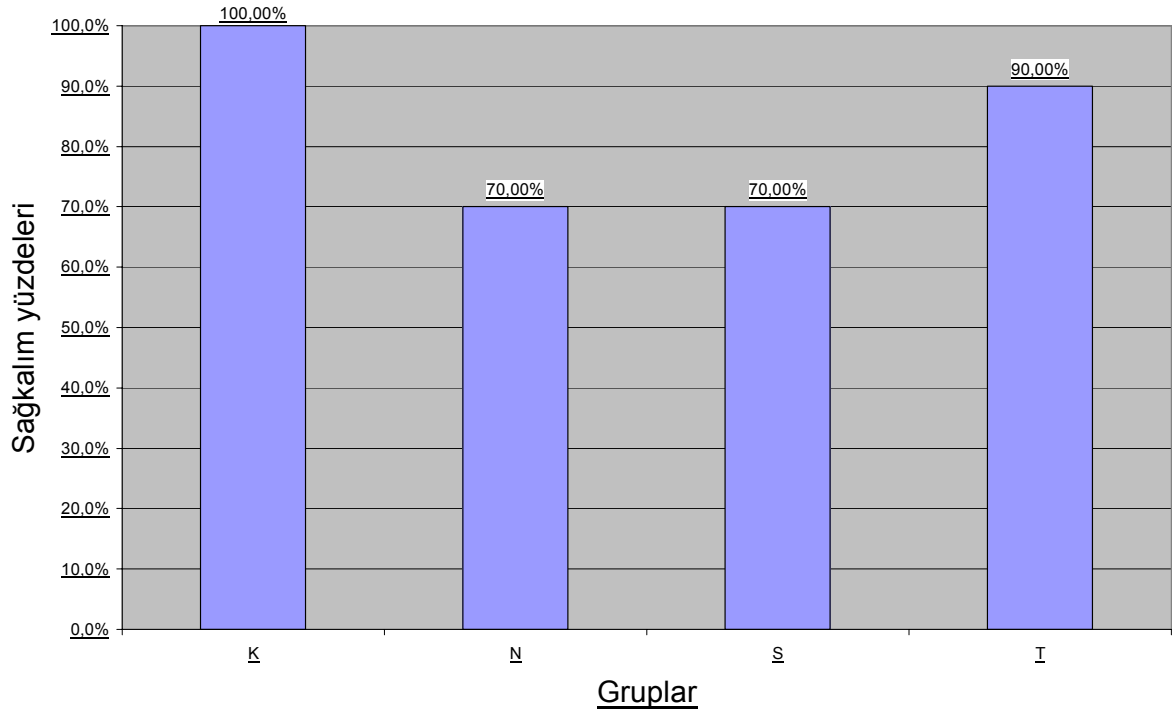
Anlamlılık seviyesi 0.05 olarak alındı. $P < 0.05$ anlamlı olarak değerlendirildi.

5. BULGULAR

5.1. Sağ kalım oranları

K grubundaki tüm ratlar yaşarken, T grubunda 1 rat 2. günde aspirasyon sonucu öldü. N grubunda 1.günde 1 rat aspirasyon sonucu, 3 günde 1 rat ve 4.günde yine 1 rat öldü. S grubunda 3. günde 1 rat ve 4. günde de 2 rat öldü. Tüm grupların sağ kalım oranları Tablo 3’de gösterildi. Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında N ve S gruplarındaki mortalite oranları diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksek bulundu (P= 0,02). N ve S grupları arasında anlamlı fark bulunamadı (P=0.917). T grubu ile K grubu arasında da anlamlı fark bulunamadı (P=0.612). Sağ kalım yüzdeleri Grafik 1’de gösterilmiştir.

Grafik 1: Tüm gruplardaki ratların sağ kalım yüzdeleri



Tablo 3: Tüm grupların sağ kalım oranları, ağırlık ortalamaları ve ağırlık değişimleri

GRUPLAR	SAGKALIM ORANLARI	İLK AĞIRLIK (gr.)	SON AĞIRLIK (gr.)	AĞIRLIK DEĞİŞİMİ
K	10/10	6.01± 0.30	9.71± 0.42	+ 3.69± 0.52 ^β
N	7/10	5.53± 0.30	4.33± 0.30	-1.20± 0.54
S	7/10	5.63± 0.42	4.15± 0.30	-1.49± 0.48
T	9/10 ^α	5.22± 0.27	4.57± 0.21	-0.65± 0.31

Değerler Ortalama ± SD olarak verilmiştir

α: Grup N ve S göre P=0.02

β: Grup N, S ve T'ye göre P=0,0005

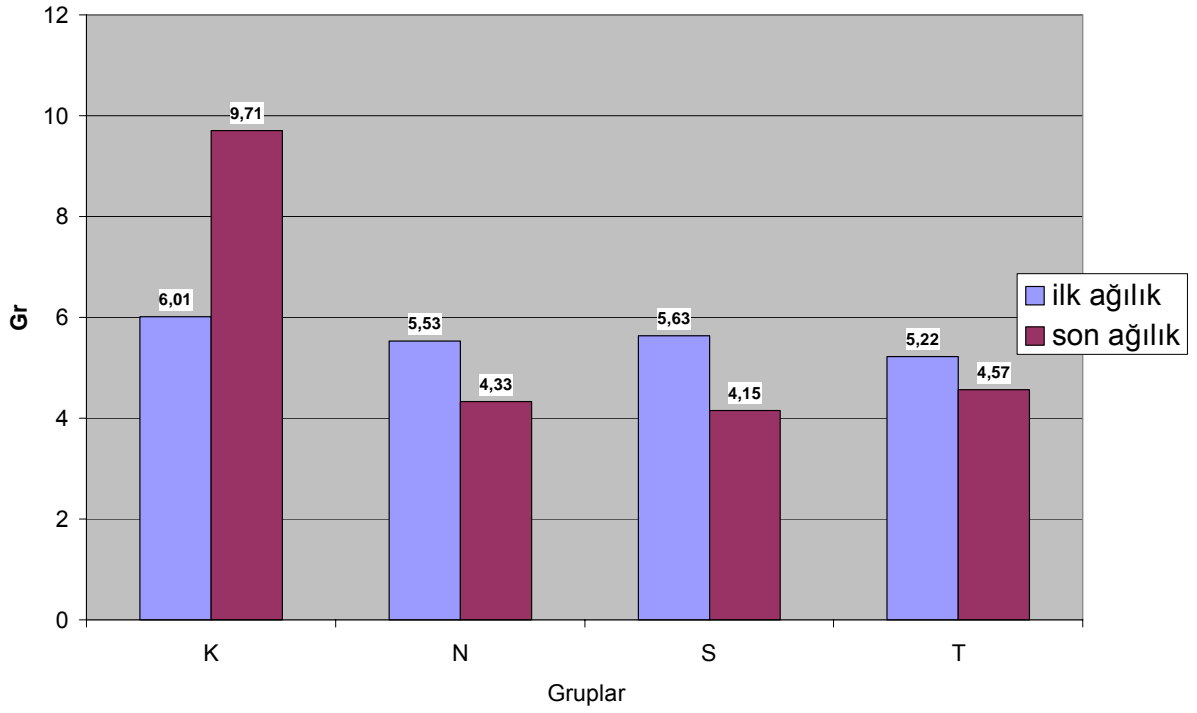
5.2. Ağırlık değişimi

Tüm ratların ilk ve 4.gün ortalama ağırlıkları ve değişimleri Tablo 3'de gösterilmiştir. İlk ağırlıkları karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı. Anne sütü ile beslenen K grubundaki ratlarda ortalama 3.69± 0.52 gr ağırlık artışı olurken, N grubunda ortalama 1.20± 0.54 gr, S grubunda ortalama 1.40± 0.48 gr ve T grubunda ortalama 0.64± 0.31 gr ağırlık azalması gözlemlendi (Resim 6). T grubundaki ortalama ağırlık azalması N ve S gruplarındakilerden daha az olsada, diğer gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi (P=0,0005). İlk ve son ağırlık değişimlerinin ortalama değerleri Grafik 2'de gösterilmiştir.



Resim 6: K grubundaki rat ile N, S, T gruplarındaki ratlar arasında gelişme farklılığı görülmektedir.

Grafik 2: Tüm gruplardaki ratların ilk ve son ağırlık değişimlerinin ortalama değerleri



5.3. Makroskopik bulgular

Çalışma sonrası alınan barsakların makroskopik incelemesinde, K grubundaki bütün ratların barsakları normal görünümde idi (Resim 7). T grubunda 2 ratın barsağında hafif dilatasyon görüldü ve diğer ratların barsaklarında renk değişikliği görülmedi. N grubunda 3, S grubunda 2 ratta barsaklarda mavi-siyah renk değişikliği ve nekroz gözlemlendi (Resim 8). N ve S grubundaki kalan tüm rat barsaklarında yaygın gaz ve dilatasyon mevcuttu (Resim 9).



Resim 7: Kontrol grubundaki ratta makroskopik olarak normal barsak görünümü.



Resim 8: NEK grubundaki ratta makroskopik olarak nekroze barsak görünümü.



Resim 9: NEK grubundaki ratta makroskopik olarak gazlı barsak görünümü.

5.4. Histopatolojik bulgular

Tüm gruplardaki barsak dokuları standart H&E boyama sonrası histopatolojik olarak değerlendirildi ve sonuçlar Tablo 4’de gösterildi.

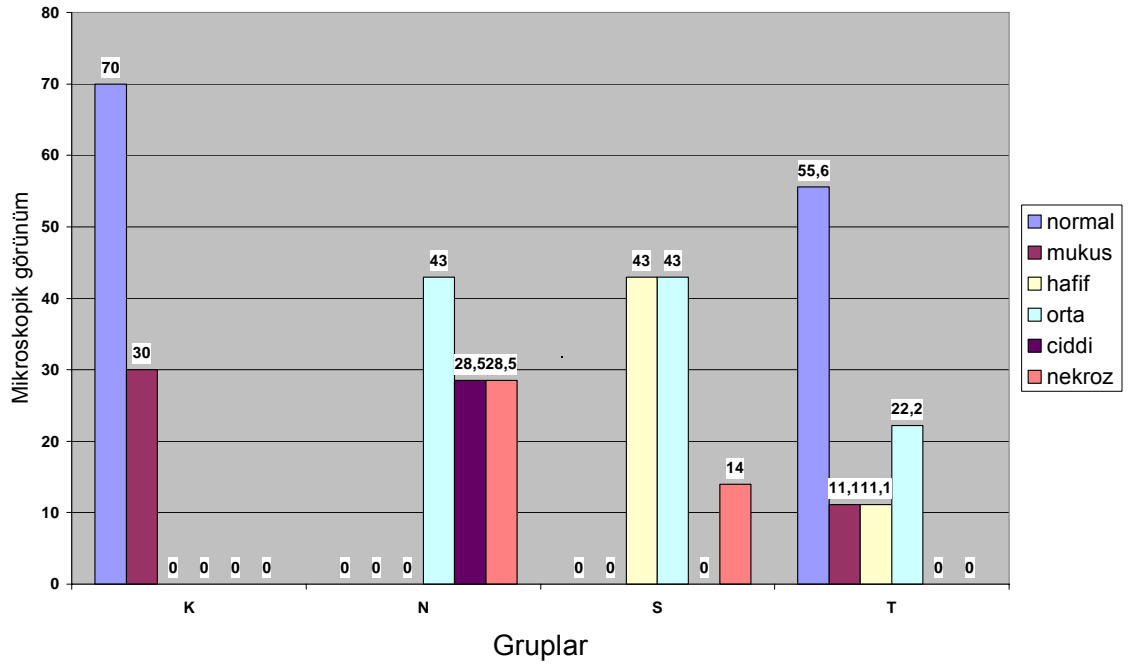
K grubundan alınan örneklerden 7’sinin normal (Resim 10 ve 13) morfolojiye sahip olduğu, 3’ünde villuslarda mukus zenginliği ve aynı zamanda tüm preparatlardaki villus hücreleri içerisinde süt damlacığı olduğu gözlemlendi. N grubundan alınan örneklerden 3’ünde orta düzeyde, 2’sinde ciddi düzeyde ve diğer 2’sinde transmural nekroz (Resim 11) tespit edildi. S grubundan alınan örneklerin 3’ünde hafif epitelyal dökülme, 3’ünde orta düzeyde villus hasarı, 1’inde transmural nekroz gözlemlendi. T grubundan alınan örneklerin 5’i normal (Resim 12), 1’inde villuslarda mukus zenginliği, 1’inde hafif epitelyal dökülme ve 2’sinde de orta düzeyde villus hasarı tespit edildi. Tüm gruplar değerlendirildiğinde K grubunun % 70’i normal ve % 30’unda da villuslarda mukus zenginliği gözlemlendi. N grubunun % 43’ünde orta düzeyde, % 28,5’inde ciddi düzeyde villus hasarı gözlenirken, % 28,5’inde transmural nekroz gözlemlendi. Yine S grubunun % 43’ünde hafif, % 43’ünde orta düzeyde villus hasarı gözlenirken, % 14’ünde transmural nekroz tespit edildi. T grubunun % 55,6’sı normal, % 11,1’inde mukus zenginliği ve % 22,2’sinde orta düzeyde villus hasarı tespit edildi. İstatistiksel analizde gruplar arasında anlamlı fark olduğu görüldü (P= 0.002). İleri istatistiksel analizde, T grubu çıkarıldığında, N ile S arasında anlamlı bir fark görülmedi (P= 0.106). Burada asıl farkı yaratan grubun T grubu olduğu görüldü. Tüm grupların histopatolojik değerlendirme skorlarının yüzdeleri Grafik 3’de gösterilmiştir.

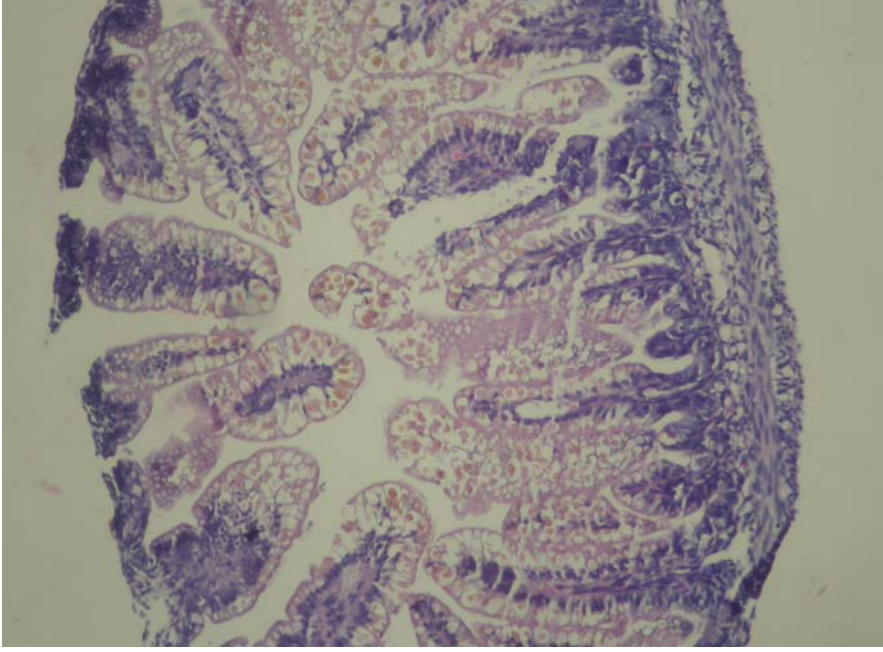
Tablo 4: Tüm grupların histopatolojik inceleme skorlaması

GRUPLAR		K(n=10)	N(n=7)	S(n=7)	T(n=9) ^γ
Evre 0	Normal barsak	7 (%70)	0	0	5 (%55,6)
Evre1A	Barsak villusunda hafif mukus zenginliği	3 (%30)	0	0	1 (%11,1)
Evre1B	Barsak villus epitelinde hafif dökülme	0	0	3 (%43)	1 (%11,1)
Evre2	Barsakta orta düzeyde villus hasarı	0	3 (%43)	3 (%43)	2 (%22,2)
Evre3	Barsakta ciddi düzeyde villus hasarı	0	2 (%28,5)	0	0
Evre4	Barsakta transmural nekroz	0	2 (%28,5)	1 (%14)	0

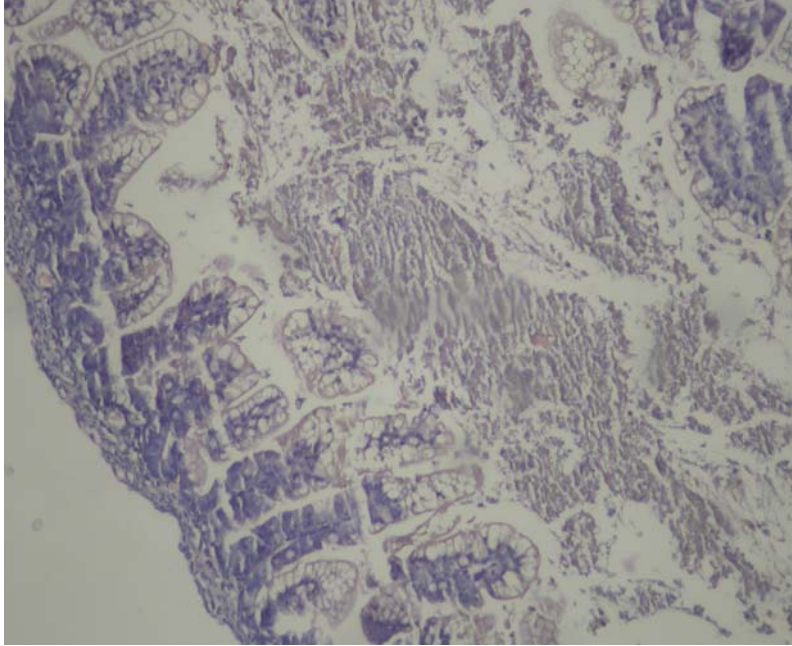
γ: Grup N ve S'ye göre P= 0.002

Grafik 3: Tüm grupların histopatolojik değerlendirme skor yüzdeleri

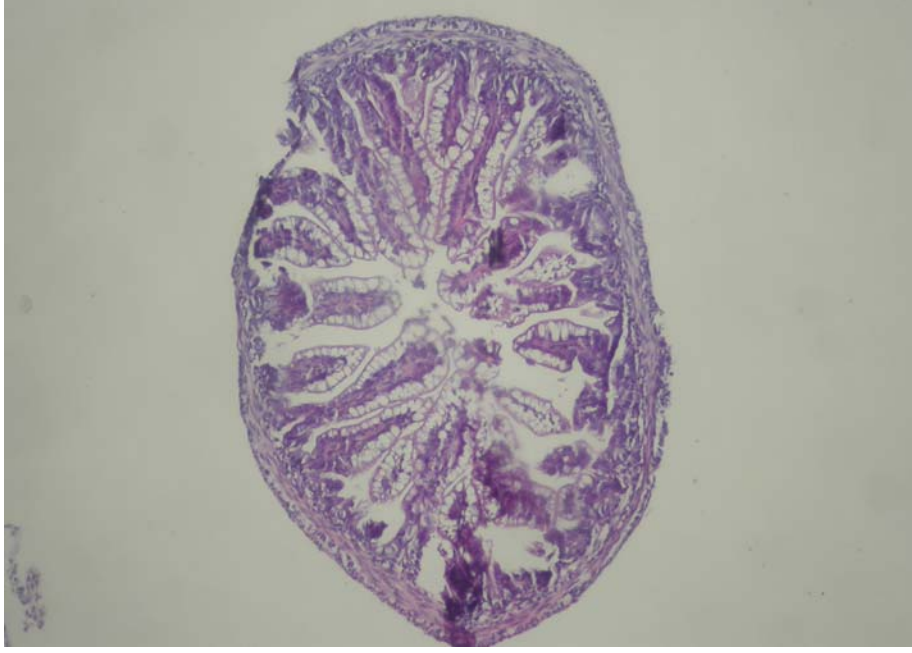




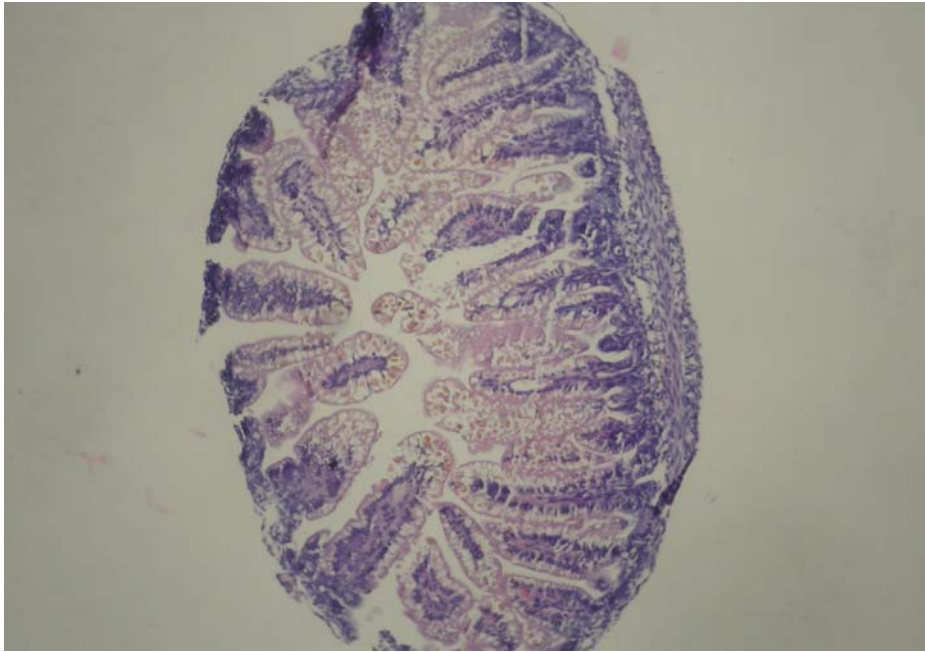
Resim 10: Histopatolojik olarak K grubundaki normal barsak görünümü (H&E x 20)



Resim 11: Histopatolojik olarak N grubunda transmural nekrozun olduğu barsak görünümü (H&E x 20).



Resim 12: Histopatolojik olarak T grubunun normal barsak görünümü(H&E x10)



Resim 13: Histopatolojik olarak K grubunda normal barsak görünümü. (H&E x 10)

5.5. Apoptozis Bulguları

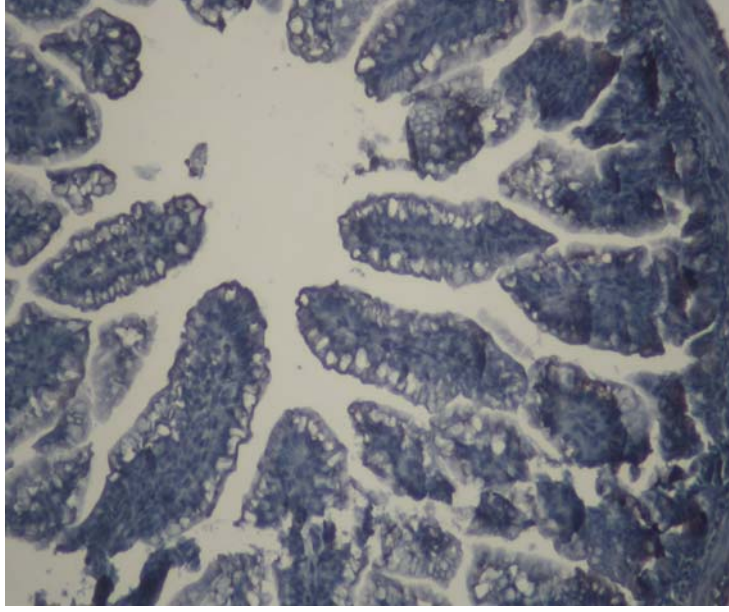
Tüm gruplar arasındaki histopatolojik apoptozis değerlendirilmesi ve skorlaması Tablo 5’de gösterilmiştir. Çalışmada apoptozis dağılımı hiç olmayanlar “0” (Resim 14), % 0–

33% arası olanlar “+”(Resim 15), % 33–66 arası olanlar “++”(Resim 16) ve % 66 üzeri olanlar “+++”(Resim 17), olarak değerlendirildi. K grubundaki preparatların 4 tanesinde % 0–33, 6 tanesinde de “0” apopitozis olduğu tespit edildi. N grubunda 5 preparatta % 66 üzerinde, 2 preparatta da % 33–66 arasında apopitozis olduğu gözlemlendi. S grubunda örneklerin 1’inde % 66 üzerinde, 6 preparatta % 33- 66 apopitozis tespit edildi. T grubundaki preparatların 3 tanesinde % 33- 66 arası, 5 tanesinde % 0- 33 arası, 1’inde 0 Apopitozis olduğu gözlemlendi. Apopitozis dağılım yönünde gruplar karşılaştırıldığında anlamlı bir fark olduğu saptandı (P=0.009). Anlamlı farkın hangi grupta olduğunu anlamak amacıyla yapılan ileri analizler için, Apopitozis dağılım derecesi: 0- %33 arası olanlara grup 1 ve % 33–66 üzeri olanlara grup 2 denildi. Gruplar arasında yapılan istatistiksel analizde, apopitozis dağılım açısından T grubu analiz dışı bırakıldığında, N ve S grupları arasında anlamlı fark bulunmadığı saptandı (P= 0.302). Buna göre farkı oluşturan grubun T grubu olduğu görüldü. T grubu, N ve S grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark olduğu görüldü (P 0.01).

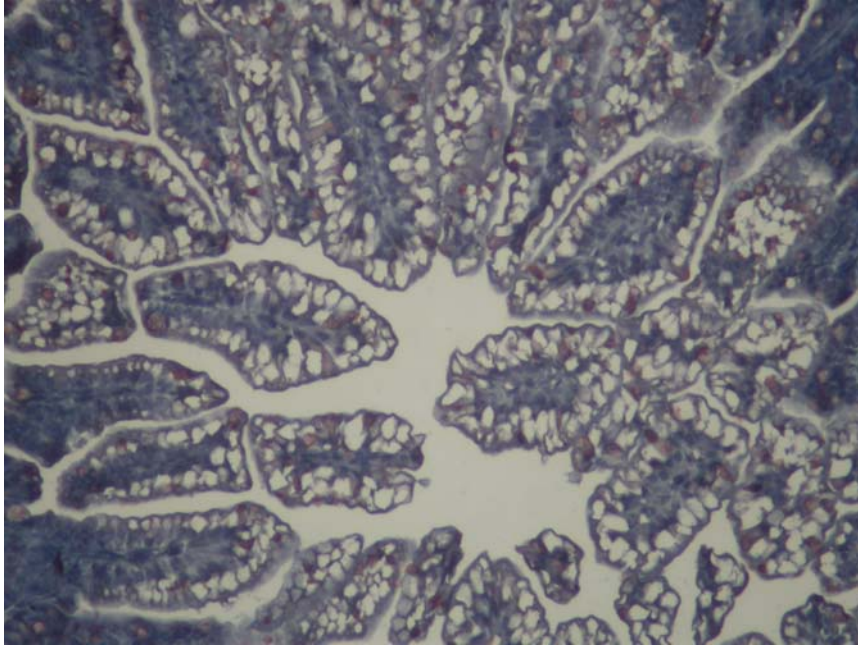
Tablo 5: Tüm grupların histopatolojik incelemede apopitozis skorlaması ve yüzdeleri

	0	+	++	+++
K (n=10)	6 (% 60)	4 (% 40)	0	0
N (n= 7)	0	0	2 (% 28,5)	5 (% 71,5)
S (n= 7)	0	0	6 (%85)	1 (%15)
T (n=9)^λ	1 (% 11,1)	5 (% 55,5)	4 (% 33,3)	0

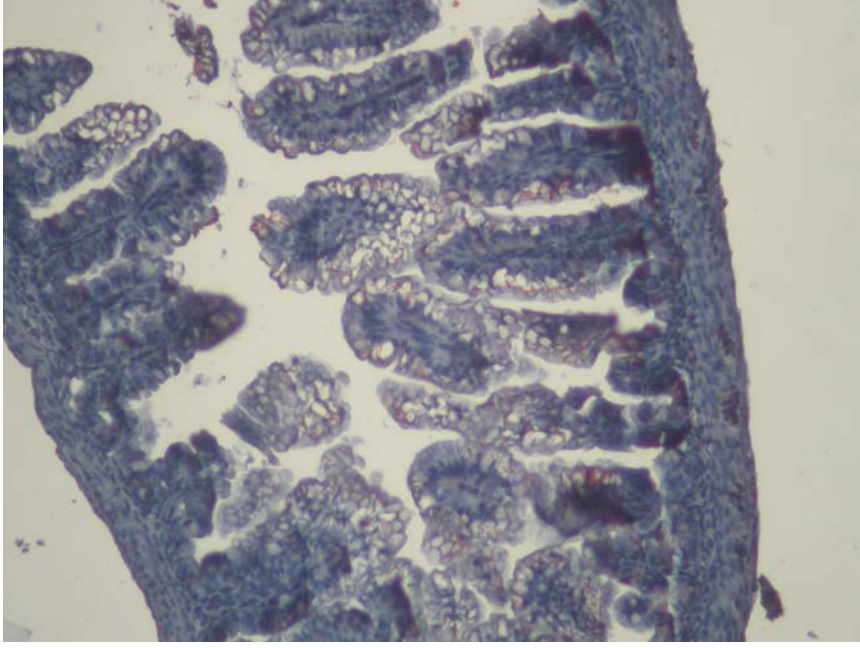
λ: Grup N ve S’ye göre P= 0.01



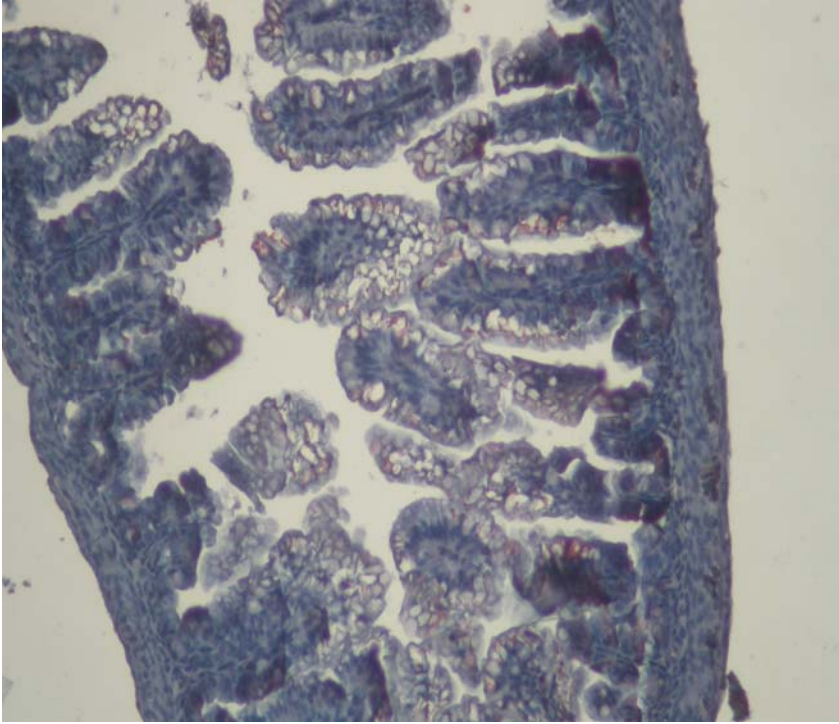
Resim 14: Histopatolojik olarak apoptozis dağılımı olmayan görünüm (x20).



Resim-15: Histopatolojik olarak apoptozis dağılımı “+” olan görünüm (x 10).



Resim 16: Histopatolojik olarak apoptozis dağılımı “++” olan görünüm (x10).



Resim 17: Histopatolojik olarak apoptozis dağılımı “+++” olan görünüm (x 20).

5.6. Doku CD4 değerleri

Doku CD4 prepratları, boyamadan kaynaklanan teknik hatalardan dolayı değerlendirilemedi.

5.7. Doku MPO değerleri

Çalışmada barsak dokusu MPO üretiminin değerlendirilmesi için doku örneklerinden ölçülen MPO seviyeleri tespit edildi ve grupların ortalama değerleri Tablo 6’da gösterildi. MPO sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark olduğu tespit edildi (P=0,0005). Yapılan ileri testlerde, N ile K grupları arasında (P=0,046), S ile K grupları arasında (P=0.001) ve S ile T grupları arasında (P= 0,003) anlamlı farklar bulundu. N ile S grupları arasında (P= 0,387), N ile T grupları (P= 0,148) ve K ile T grupları arasında (P=0,953) anlamlı farklar bulunmadı. Tüm gruplar arasındaki ortalama MPO değerleri Grafik 4’de gösterilmiştir.

Tablo 6: Tüm grupların doku MPO, IL-6 ve TNF- α değerleri

GRUPLAR	K	N	S	T
MPO (U/ mg.prot.)	0.26± 0.02 [#]	0.69± 0.05 ⁺	0.95± 0.42	0.33± 0.02 [*]
IL-6 (pg/ ml)	0.90±0.34 ^{&}	2.05± 0.50	1.85± 1.20	1.10± 0.34 [◆]
TNF- α (pg/ml)	0.33± 0.18	1.93± 1.03	2.41± 1.31	0.72± 0.55 [@]

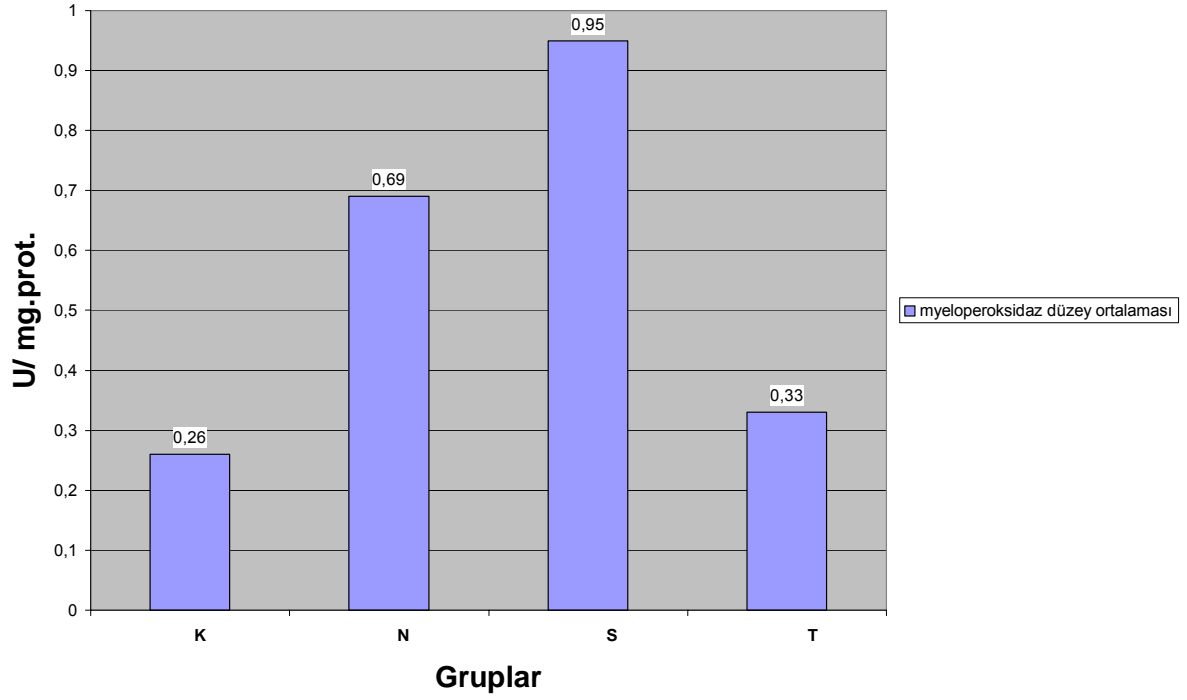
Değerler ortalama \pm SD olarak verilmiştir.

*: Grup S göre P=0.003, #:Grup S göre P=0.001 ve Grup N göre P=0.046.

◆ : Grup N’ye göre P=0.030, & : Grup N’e göre P=0,0005 ve Grup S’e göre P=0.026

@: Grup N’e göre P= 0.028 ve Grup S’e göre P=0.001

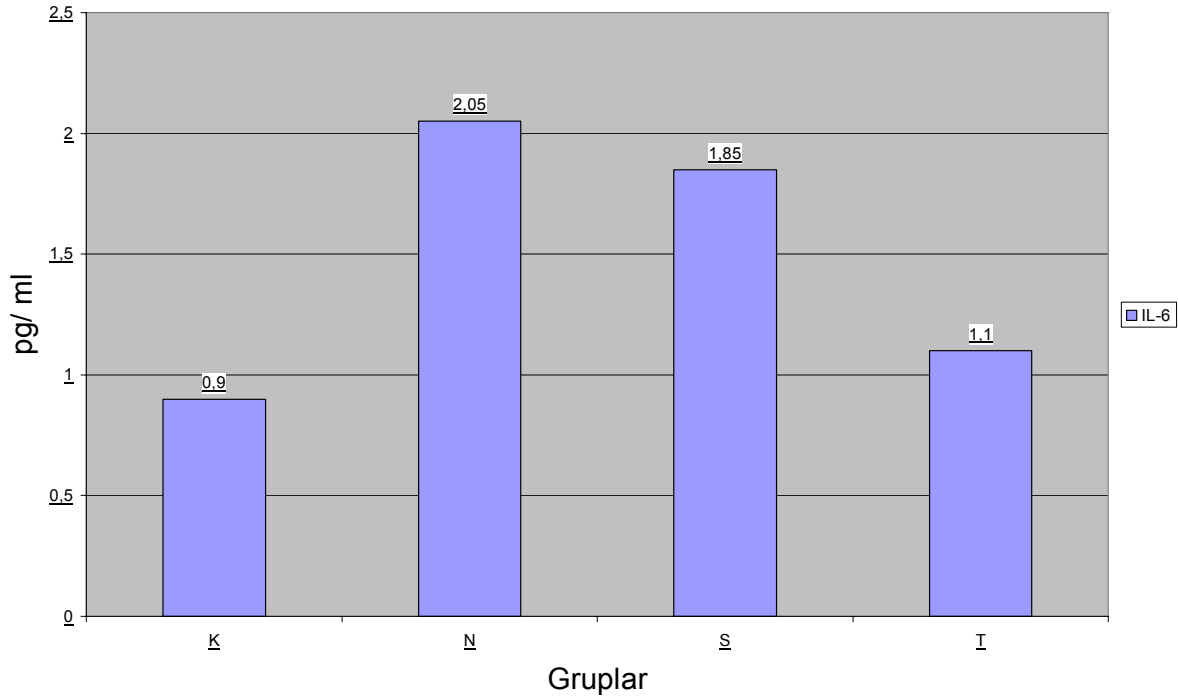
Grafik 4: Tüm gruplardaki MPO değerlerinin ortalama seviyeleri



5.8. IL-6 Doku değerleri

Barsak doku IL-6 üretiminin değerlendirilmesi için doku örneklerinde IL-6 seviyeleri tespit edildi ve grupların ortalama değerleri Tablo 6' da gösterildi. Çalışmada K grubunda IL-6 seviyesi ortalama 0.90 ± 0.34 pg/ ml , N grubunda 2.05 ± 0.50 pg/ ml , S grubunda 1.85 ± 1.20 pg/ ml ve T grubunda ise 1.10 ± 0.34 pg/ ml olarak bulundu. Tüm grupların IL-6 seviyeleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($P= 0.002$). Grupların kendi aralarındaki karşılaştırmaları, ikincil teste göre yapıldığında, IL-6 değerleri açısından N ve S grupları arasında ($P= 0.927$) , K ile T grupları arasında ($P= 0.914$) ve S ile T grupları arasında da ($P=0.119$) anlamlı fark olmadığı tespit edildi. N ile K grupları ($P= 0,0005$), N ile T grupları ($P= 0.030$) ve S ile K grupları ($P=0.026$) karşılaştırıldığında anlamlı fark olduğu tespit edildi. Tüm gruplardaki ortalama IL-6 değerleri Grafik 5'de gösterilmiştir.

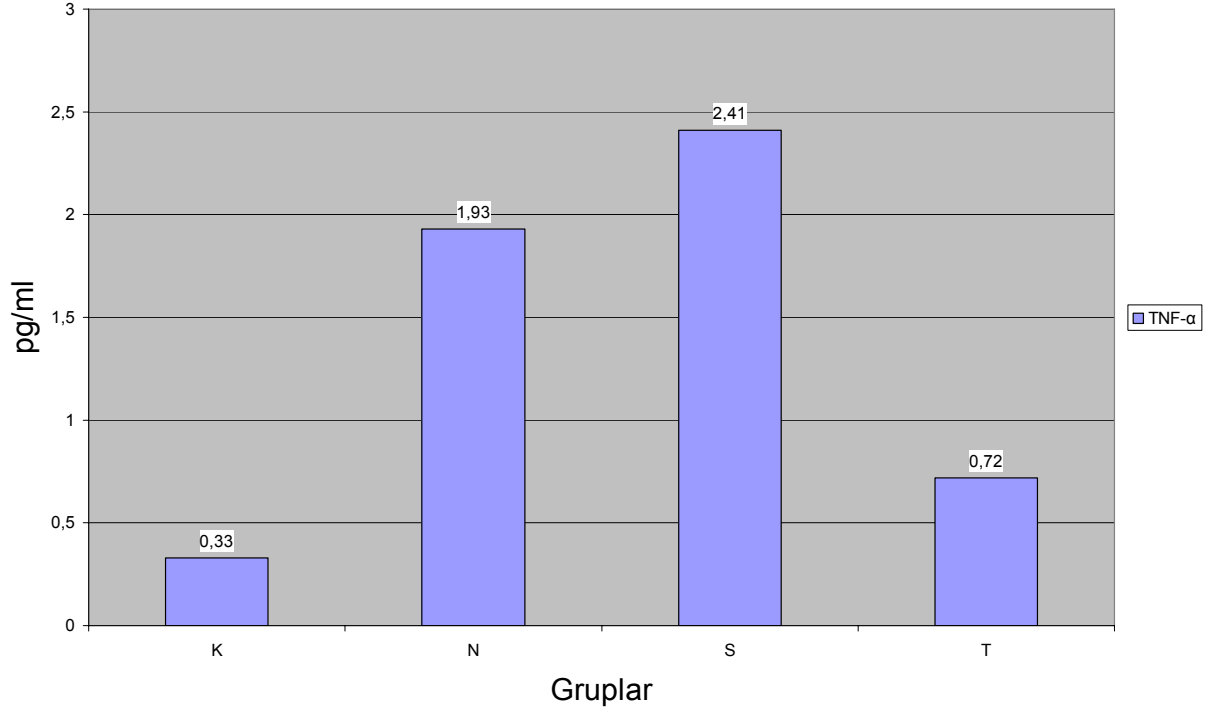
Grafik 5: Tüm gruplardaki IL-6 değerleri



5.9. Doku TNF- α değerleri

Barsak dokusu TNF- α üretimini değerlendirmek için doku örneklerinde TNF- α seviyeleri tespit edildi ve grupların ortalama değerleri Tablo 6'da gösterildi. Çalışmada kontrol grubunda TNF- α değeri ortalama 0.33 ± 0.18 pg/ ml bulundu. N grubunda 1.93 ± 1.03 pg/ ml, S grubunda 2.41 ± 1.31 pg/ ml ve T grubunda ise ortalama 0.72 ± 0.55 pg/ ml olarak bulundu. Tüm grupların TNF- α değeri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($P= 0.002$). Grupların kendi aralarındaki karşılaştırmaları, ikincil teste göre yapıldı. TNF- α değerleri açısından N ve S grupları arasında ($P= 0.672$) ve K ile T grupları arasında ($P= 0.759$) anlamlı fark olmadığı tespit edildi. S ile T grupları arasında ($P= 0.001$), N ile T grupları arasında ($P= 0.028$) ve S ile T grupları arasında ($P=0.001$) anlamlı fark olduğu tespit edildi. Tüm gruplar arasındaki ortalama TNF- α değerleri Grafik 6'de gösterilmiştir.

Grafik 6: Tüm gruplardaki TNF- α ortalama değerleri



6. TARTIŞMA VE SONUÇ

NEK yenidoğanın gastrointestinal sistemini tutan ve ölümcül sonlanan bir hastalık olup görülme sıklığı her geçen gün artmaktadır. Günümüzde, yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde tetkik ve tedavi metodlarının gelişmesi, prematür bebek bakımında sağlanan başarılarından dolayı hastaların sağkalım oranlarının artması sonucunda, NEK'in teşhis ve tedavisinde büyük aşamalar kaydedilmiştir.

NEK etyopatogenezinde sorumlu tutulabilecek birçok risk faktörü bulunmasına rağmen kesin sebep henüz ortaya konabilmiş değildir. Son dönemde oluşturulan deneysel hayvan modelleri, genellikle etyolojide en fazla suçlanan faktörler olan, prematürite, hipoksi, formüle mama ile beslenme, intestinal iskemi-reperfüzyon hasarı ve enfeksiyon temeline dayandırılmaktadır. Bu modellerde oluşturulan barsak hasarlarında histopatolojik ve biyokimyasal olarak NEK benzeri değişiklikler ortaya konmuştur.

Barlow ve ark.²⁷ yaptıkları deneysel çalışmada, kapalı ortamda hipoksi ve soğuk strese maruz bırakılan yenidoğan ratlarda histopatolojik olarak NEK benzeri intestinal hasar oluşturmuşlardır. Mevcut hasarın hipoksi ve soğuk stresin süresiyle doğru orantılı olarak arttığını ve hipoksiyle birlikte oral formüle mama ile beslenmenin hasarı daha da arttırdığını ortaya koymuşlardır.

Nadler ve ark.⁸⁴ kendileri tarafından tanımlanan hiperosmolar formüle mama ile beslenen yenidoğan ratların ince barsaklarında, biyokimyasal ve histopatolojik kriterlerle ortaya konan NEK benzeri hasarlar tespit etmişlerdir.

NEK'e benzer intestinal hasar başka deneysel çalışmalarda da gösterilmiştir. Sibbon ve ark.⁸⁹ yaptıkları çalışmada, düşük doğum ağırlıklı domuz yavrularının mezenterik arterlerini bağlayarak 60 dk'lık iskemi ve ardından reperfüzyon yapıldığında, NEK'e benzer intestinal hasarlanmanın oluştuğunu göstermişlerdir.

Clark ve ark.⁹⁰ ile Miller ve ark.⁹¹ tavşanlarda yaptıkları çalışmalarda, NEK'li

infantların barsak içeriklerini analiz ettiklerinde, intraluminal alanda pH'ın 5 'in altında, protein değerinin 5 gr/dl'nin üstünde, yeterli miktarda karbonhidrat ve karbonhidratları organik asitlere fermente edecek bakterilerin bulunduğunu ortaya koymuşlar ve ardından, propiyonik asit ile asidifiye edilmiş sığır kazeini kullanarak adult tavşanlarda NEK modeli geliştirmişlerdir. Bu asidifiye edilmiş kazein karışımı mukozal hasara ve intralüminal hemorajiye sebep olarak NEK benzeri histopatolojik tablo oluşturmaktadır. Ancak insan infantlarındaki nekrotik barsaklardan elde edilen intraluminal içeriğin bileşimi yukarıda belirtilen özelliklere sahip olmayıp, NEK sonrası oluşan nekroza sekonder olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca bu modelde pnömotizis intestinalis görülmemekte ve yapılan laparotomi denek üzerinde travma oluşturmaktadır. Bu nedenle model NEK'in kliniği ile tam olarak bağdaşmamaktadır.

Snyder ve ark.⁹² ile Gonzalez- Crussi ve ark.⁷⁹ yaptıkları çalışmalarda erişkin ratlarda intravasküler PAF enjeksiyonunun morfolojik olarak NEK'e benzer iskemik barsak nekrozu oluşturduğunu göstermişlerdir. PAF enjeksiyonu sistemik hipotansiyon, pulmoner hipertansiyon, bronkokonstrüksiyon, kapiller sızıntı, nötrofil ve platelet agregasyonuna yol açar. Ratlara düşük doz bakteriyel endotoksin enjeksiyonu ile barsak PAF üretimini arttırıp, barsak nekrozu meydana getirildiği bu çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca NEK'li insan prematür infantlarında plazma PAF ve TNF seviyelerinde artma ve PAF asithidrolaz seviyesinde azalma olduğu da ortaya konmuştur. Bu modelin dezavantajı, hasarın ileumda istenilen düzeyde olmaması, hasarın kolon ve rektumda görülmemesi ve enflamasyonun önce sistemik olarak başlaması ve barsakların daha sonra etkilenmesidir. Barsak hasarının sepsis sonucu mu yoksa NEK'e bağlı mı geliştiğini bu modelde ayırmak güçtür. Bu hipoksi modelinde oluşan hasar iskemiye bağlıdır ve histopatolojik olarak da iskemik barsak hasarı oluşmaktadır. NEK etiopatogenezine bakıldığında mekanizmayı sadece hipoksiye veya iskemiye bağlamak uygun olmaz kanısındayız.

Çalışmamızda model tespiti yaparken bu modeller gözden geçirilerek klinik açıdan en uygun olanı seçilmeye gayret edildi. İnfant ratlarda hiperosmolar formüla mama ile beslenmeyle oluşturulan NEK modeli, klinik seyri ve barsak hasarının histopatolojisi açısından NEK'e daha fazla uygunluk gösterdiği için tercih edildi.

Hsueh ve ark.⁹³ yaptıkları hayvan çalışmasında nekrotik barsaklarda TNF- α ve PAF'da belirgin bir yükselme olduğunu ortaya koyarken, Zamora ve ark.⁹⁴ yaptıkları deneysel çalışmalarında formüla mama ile beslenen yeni doğan ratların hipoksiye maruz bırakılması sonucunda barsak dokusu IL-6 ve TNF- α değerlerinin kontrol grubuna oranla anlamlı olarak yüksek çıktığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmalar sonucunda, NEK'in oluşturulduğu hayvan modellerinde sitokinlerin doku seviyelerinin anlamlı olarak arttığı ve NEK'in oluşturduğu doku hasarı ciddiyetinin ortaya konmasında önemli parametreler oldukları tespit edilmiştir. Çalışmamızda da, sitokinlerden TNF- α ve IL-6, NEK modeli oluşumunun ortaya konması ve yapılan koruyucu tedavinin etkinliğini ortaya konulması için kullanılan parametrelerden olmuşlardır. N grubu ile T grubu arasında her iki değer içinde anlamlı farklar olduğu ortaya konmuştur.

Grisham ve ark.⁹⁵ rat barsak mukozasında iskemi ve reperfüzyon sonrası oluşan hasarın MPO aktivitesi ve dolayısıyla nötrofil infiltrasyonu üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. İskemi sonrası reperfüze edilen barsak dokusu, iskemi oluşturulmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, MPO aktivitesinin çok yükseldiğini ve bunun da nötrofil infiltrasyonuna bağlı olduğunu rapor etmişlerdir. Alican ve ark.⁹⁶ yaptıkları hayvan çalışmasında yanık travmasının erken ve geç dönemde oluşan GİS problemlerinin (GİS hemorajisi, gastrik ileus, GİS mukoza hasarı) tedavisi için Bombesin kullanmışlardır. Bombesinin barsak motilitesini düzenlediği, barsak dokusunda MPO'yu azalttığı ve intestinal inflamasyonu engellediğini tespit etmişlerdir. Çalışmamızda MPO seviyelerinin N ve S gruplarında yüksek çıkması, T grubunda ise anlamlı olarak düşük çıkması bu çalışmaları

desteklemektedir.

Caplan ve ark.³¹ tarafından yapılan hayvan çalışmasında, NEK'lı hayvanların barsak segmentinden yapılan histopatolojik incelemede daha ciddi düzeyde villüs hasarı ile transmural nekroz ile karşılaşmışlardır. Ancak tedavi amacıyla Bifidobacteri verilenlerde orta düzeyde villus hasarı olduğu saptanmıştır. Yine Ballance ve ark.³⁷ ları tarafından yapılan diğer bir klinik çalışmada, NEK'lı hastaların barsak segmentlerinin histopatolojik incelemesinde % 89'unda koagulasyon nekrozu görüldüğü tespit edildi.

Ford ve ark.⁹⁷ tarafından yapılan klinik bir çalışmada, NEK'lı hastaların barsak segmentinde yapılan histopatolojik incelemede, barsak düz kaslarında daha az olmak üzere lamina propriada apoptotik hücreler tespit edilmiştir. Yine Papconstantinou ve ark.⁹⁸ tarafından yapılan deneysel bir çalışmada, glutaminin barsak hücrelerini apoptozisten korumada etkili olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda da N ve S gruplarından elde edilen mikroskopik görüntülerde apoptozis hücrelerinin belirgin olarak arttığı tespit edildi.

Günümüze dek NEK'in önlenmesi ve tedavisi ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda, barsağa direkt verilen nitrogliserin, TNF- α 'nın ve Eritropoetin düşük doğum ağırlıklı infantlarda sistemik uygulanmasının, oral Epidermal Growth Faktör (EGF) uygulamasının NEK gelişimini önlemede faydalı yöntemler olduğu gösterilmiştir⁹⁹⁻¹⁰³. Yine Celini ve ark.¹⁰⁴ intrauterin EGF verilen rat fetüslerinin barsak villus uzunluğu ve mukozal proliferasyonunun arttığını tespit etmişlerdir. Zhang ve ark.¹⁰⁵ da Trefoil faktor-3'ün NEK'in tedavisi ve önlenmesinde etkili olduğunu söylemişler. Canpolat ve ark.¹⁰⁶ yaptığı klinik çalışmada enteral insan granülosit koloni stimule edici faktörün (rhG-CSF), erken evre NEK'lerin hem korunmasında hem de önlenmesinde etkili olduğunu göstermişlerdir. Çiftçi ve ark.¹⁰⁷ yaptığı hayvan deneylerinde İNOS'un selektif inhibitörü olarak oral Aminoguanidine'nin, doku NO seviyesini normale yakın seviyeye getirdiğini ve barsak hasarını azalttığını göstermişlerdir.

Salgısal IgA anne sütündeki en önemli immünglobülinidir. Anne sütünde IgA seviyesi doğum sonrası ilk günlerde en yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve barsaktan emilmediği düşünülen IgG nispeten daha az miktardadır. Bu salgısal IgA proteolitik enzimlere dirençli olduğu için gastrointestinal sistemin üst bölümlerinde etkilenmeden ince barsaklara kadar ulaşabilir ^{46,59,108}. Annenin emzirdiği ilk süttten (kolostrum) ve anneden geçen IgG bebeğin barsak mukozasından geçerek, doğumu izleyen ilk günlerinde pasif bağışıklığı güçlendirmektedir ^{56,57}. Prematür yenidoğanlarda ilk dört haftada, bakterileri öldüren gastrik asit ve pepsin seviyeleri düşük, barsak mukozasından koruyucu müküs salınımı yetersizdir. Garzon ve ark.¹⁰⁹ yenidoğan ratların mide asit sekresyonu ile ilgili çalışmalarında rat yavrularının gastrik pH'larının ilk 20 günde nötr (pH:6.11±0.15) olduğunu bildirmişlerdir. Diğer yandan, prematürlerde fonksiyonel B lenfosit seviyeleri yetersiz olduğundan dolayı, sentezlenen sekretuar IgA da yetersiz kalmaktadır. Bundan dolayı prematür yenidoğanların barsaklarında koruyucu Ig'ler ve özellikle de IgA yetersizdir. Plazmadaki IgA'lar toksin inaktivasyonunu sağlayarak, lökositleri aktive ederek, serumda bakterisidal aktiviteyi artırarak, sitokin etkilerini engelleyerek ve kompleman sistemini düzenleyerek koruyucu etkilerini gösterirler ¹¹⁰. Sharma ve ark.¹¹¹ yaptıkları klinik çalışmada, yenidoğan NEK'li hastaların %29'unda rotavirüs saptamış ve bu hastaları anne sütü ile besleyerek immünitelerini arttırdıklarında NEK insidansının azaldığını ortaya koymuşlardır.

Probiotikler, barsaklarda immüniteyi düzenleyip, musin, antibakteriyal ajanlar ve Ig A'nın salgılanmasını sağlayarak, mikroorganizmaların barsak mukozasına bağlanmasını önler. Diğer yandan barsak mukoza geçirgenliğini azaltarak ve antiinflamatuvar sitokinlerin yapımını arttırarak koruyucu etkilerini gösterirler. Chih Lin ve ark.¹¹² NEK'in majör etiopatogenezinde rol alan prematür yenidoğanlar üzerindeki klinik çalışmada, prematür barsaklarının bakteri kontaminasyonunda büyük rol oynadığını ve bu hastalara uzun süreli

olarak probiotikler (*Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacteriu infantis*) verildiğinde, probiotik verilmeyenlere göre üriner enfeksiyon, bakteriyal sepsis ve NEK'in görülme sıklığında belirgin azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Yine Alona Bin-Nun ve ark.¹¹³ preterm yenidoğanlarda proflaktik probiotik uygulaması ile NEK insidansındaki azalma hipotezlerini test etmek için klinik çalışma yapmışlar ve probiotik karışımı (*Bifidobakter inafantus*, streptokok termofilis ve *bifidobakter bifidus*; solgar, israiel) verilen grupta NEK insidansının verilmeyen gruba göre istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen, hastalığın ciddiyeti ve mortalitesinde azalma olduğunu göstermişlerdir.

Lın ve ark.¹¹⁴ tarafında yapılan çalışmada, probiotiklerin, IgA salgısını arttırdığı, mikroorganizmaların mukoza hücrelerine bağlanmalarını ve dolayısıyla onların dış yüzeylerinde kolonize olmalarını veya epitel hücrelerini enfekte etmelerini önlediği saptanmıştır. Barsağa besinlerle ulaşan probiotiklerin makromoleküllerle birleşerek, absorbe olmayan kompleksler oluşturarak etki ettikleri ortaya konmuştur.

Eible ve ark.⁵ tarafından oral anne sütü alamayan düşük doğum ağırlıklı infantlarda oral verilen Ig'lerin (% 73,04 IgA , % 25.87 IgG ve %0.74 IgM) NEK üzerindeki etkilerini araştırmak için randomize klinik çalışma yapılmış ve doğumdan sonra 28 gün süre ile günde 3 kez 600 mg oral IgA-G mama ile kombine edilerek verilmiştir. Çalışma sonucunda bu yenidoğanlarda oral IgA-G verilmesi ile NEK gelişiminin önlenebileceği anlamlı olarak ortaya konmuştur. Eible ve ark.¹¹⁵ tarafından yapılan diğer bir klinik çalışmada, proflaktik olarak ağızdan verilen IgG-A'nın (% 70 IgA ve % 25 IgG) barsak mukoza seviyesinde inflamatuvar mediatörlerin (TNF- α ve IL-6) ortaya çıkmasını inhibe ederek NEK gelişimini önlediği istatistiksel olarak kanıtlanmıştır.

Yine Rubaltelli ve ark.⁶ tarafından yapılan randomize klinik çalışmada oral anne sütü alamayan düşük doğum ağırlıklı preterm yenidoğanlara oral verilen Ig'lerin (% 90 üzerinde monomerik IgG, geriye kalan ise dimerik veya polimerik IgG ve düşük miktarda da IgA ve

IgM içeren) NEK 'in önlenmesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu yenidoğanların bir kısmına 15 gün süreyle 500 mg monomerik Ig G günde 5 doz halinde verilirken diğer gruba yalnız formula mama verilmiş; klinik, biyokimyasal ve histopatolojik sonuçlara göre oral monomerik Ig G verilerek NEK gelişiminin önlenebileceği bildirilmiştir.

Zarzaur ve ark.¹¹⁶ tarafından yapılan deneysel çalışmada, enteral beslenmeyip parenteral beslenen ratlara TPN'ye ek olarak Bombesin verilenlerde hem intestinal hem de solunum sistemi Ig A seviyelerinin korunarak, GİS ve solunum sistemindeki sitokinlerin etkinliğinin korunduğunu göstermişlerdir. Sangild ve ark.¹¹⁷ preterm domuz yavrularının bir grubuna formula mama, bir grubuna da kolostrum vermişler. Formula mama verilenlerin %57' sinde, kolostrum alanların ise %5'de NEK saptanmıştır. Mama ile beslenenlerde, villus uzunluğu, enzim aktiviteleri, besin emilimi, antioksidan seviyeleri ve NO aktivitelerinin azalmış olduğunu tespit etmişlerdir.

Lawrence ve ark.⁸ tarafından da bu konu üzerine bir çok merkezde çift kör plasebo kontrollü klinik çalışmalar yapılmıştır. Düşük doğum kilolu yenidoğanlara, 28 gün boyunca 1200 mg /kg/ gün oral IgG verilirken, diğer gruba ise 150 ml /kg % 30 albumin, plasebo olarak normal oral beslenmeye eklenmiş ve gruplarda kesin NEK gelişen ve ölen yenidoğanların sayısı araştırılmıştır. Çalışmada enteral beslenmeye insan IgG'sinin eklenmesi ile NEK gelişiminin azalmadığı sonucuna varılmıştır.

Richter ve ark.⁹ tarafından yapılan klinik çalışmada çok düşük doğum ağırlıklı 3. seviye yoğun bakım hemşirelik bakımı gerektiren yenidoğanlar çalışmaya alınmış. Bir gruba günde 6 doz olmak üzere insan IgG' si (100 mg/kg) 28 gün süre ile oral verilirken diğer gruba oral IgG verilmemiştir. Bu çalışmada oral IgG verilen ile verilmeyenler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı bildirilmiştir. Fast ve ark.¹⁰ NEK' in profilaksisi için IgA-IgG'ye karşı oral gentamisin'in etkisini araştırmışlar. Oral IgA-IgG verilen grupta % 13 NEK gelişirken oral gentamisin kullananların sadece % 1'inde NEK gelişmiştir.

Çalışmamızda Nadler ve ark.⁸⁴ nin tanımladığı şekilde yenidoğan ratları doğduktan sonra ilk 4 gün hiperosmolar formül mama ile besleyerek NEK oluşturulması planlandı ve 4. günün sonunda rat ince barsağında makroskopik ve mikroskopik (histopatolojik) olarak gözlenen, barsak dokusunda biyokimyasal parametreler ile ortaya konan NEK modeli oluşturuldu. K grubu ile karşılaştırıldığında N grubunda barsak dokusu MPO, IL-6 ve TNF- α seviyelerinde anlamlı artış olduğu görüldü. Barsak dokusunun histopatolojik incelenmesinde (NEK'dekine benzer şekilde) “ciddi düzeydeki villus hasarı”, “transmural nekroz” ve “apoptotik hücre oranında ” gibi parametrelerde anlamlı artış olduğu gözlemlendi.

Daha önce yapılan birçok çalışmada diğer Ig' ler ile kombine verilerek NEK'i önlemede etkinliği denenmiş ancak tek başına kullanılmayan IgA' nın insan kolostrumundan hazırlanan formu ağızdan verilerek tedavi grubu oluşturuldu. Bu grubun barsak dokusu histopatolojik ve biyokimyasal parametreleri NEK grubunun ciddi doku hasarlı bulguları ile karşılaştırıldığında, K grubundakilere benzer şekilde, anlamlı oranda düzeldiği saptandı. Bu olumlu etkinin, ağızdan verilen IgA'nın mikroorganizmalara bağlanarak barsakta absorbe olmayan kompleksler oluşturması, ardından bu komplekslerin barsak yüzeyindeki enzimlerle kolayca tahrip edilip organizmadan kolayca uzaklaştırılması, sonuç olarak barsak epitel hücrelerinin enfekte olmaları önlenerek ve mikroorganizmaların toksik etkilerinden korunarak sağlandığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak; NEK hastalığında immunoprotektif ve direkt barsak mukozasını koruyucu etkisi nedeniyle, ağızdan saf IgA' nın verilmesi ile intestinal hasarlanmanın azaltılması ve normal barsak fizyolojisinin korunması sağlanabilir kanısındayız.

7. ÖZET

Amaç: : Deneysel olarak oluşturulan NEK modelinde, oral yoldan verilen IgA' nın rat barsağını koruyucu etkilerinin araştırılması

Gereç ve Yöntem: 40 yenidoğan rat 10'arlı gruplar halinde 4 gruba ayrıldı. Kontrol (K) grubu anne yanında bırakılırken, NEK (N), sham (S) ve tedavi (T) grubu anne sütü almadan, annesinden ayrı olarak 36 °C'de ve % 60'luk nemde beslenme ve bakım sağlanmak üzere özel inkübatöre yerleştirildi. K grubundaki ratlar emerek anne sütü ile beslendi. N grubundaki denekler doğar doğmaz, hiç anne sütü almadan annelerinin yanından ayrılarak formula mama ile beslendi. T grubundaki ratlara hiç anne sütü almadan formula mamaya ilaveten 600 mg/kg/gün 6 doz halinde saf oral IgA verildi. S grubundaki deneklere hiç anne sütü almadan mamaya ilaveten 0.1ml /kg/gün immünglobülin çözücüsü olan distile su verildi. Tüm gruplardaki ratlar 4.gün tartılarak, sakrifiye edildi. Laparotomi sonrası ileoçekal valvin 1 cm proksimalinden 2 cm'lik barsak segmenti histopatolojik inceleme için, geri kalan 10 cm'lik segment biyokimyasal inceleme için çıkartıldı. H&E boyama ile histopatolojik, ARC Ab-1 apoptozis kiti kullanılarak immunohistokimyasal, doku MPO, TNF- α , ve IL-6 değerlerine bakılarak biyokimyasal değerlendirme yapıldı.

Bulgular: N ve S gruplarında mortalite oranı T ve K gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($P<0.05$). K grubunda anlamlı ağırlık artış olduğu tespit edilirken, diğer gruplarda ağırlık azalması tespit edildi ($P<0.05$). Histopatolojik değerlendirme ve apoptozis dağılımına bakıldığında, T grubunun, N ve S grubundan anlamlı azalma olduğu görüldü ($P<0.05$). Doku IL-6, TNF- α ve MPO seviyeleri incelendiğinde, T grubu değerlerinin S ve N gruplarının değerlerinden anlamlı olarak düşük olduğu ($P<0.05$), ayrıca T ile K grubu değerlerin arasında anlamlı fark olmadığı tespit edildi ($P>0.05$).

Sonuç: Oral yolla verilen saf Ig A'nın deneysel NEK modelinde, intestinal hasarı azalttığı ve NEK'ı önlediği gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Nekrotizan Enterokolit, tedavi, immünglobülin A, yenidoğan.

8. SUMMARY

Purpose: Investigation of the protective effect of oral immunoglobulin(Ig) A on rat intestinum in experimental necrotizing enterocolitis model.

Materials and methods: 40 newborn rats were divided into 4 groups each containing 10 rats. While control (C) group was fed by breast, the rats in necrotizing enterocolitis (N), sham (S), and treatment (T) groups were settled into incubators at 36°C and 60 % humidity and fed, but not by breast. The rats in C group were fed by breast. The rats in N group were fed with Formula as soon as they were born. The rats in T group were fed with Formula and 600 mg/kg/day oral Ig A with 4-hour intervals. The rats in S group were fed with Formula and 0.1 ml/day distilled water which is solvent of Ig. The rats in all groups were weighed and sacrificed on fourth day. 2 cm intestinal segment from proximal of ileocaecal valve was used for histopathologic examination, another 10 cm intestinal segment for biochemical examination. After laparotomy H&E was used for histopathologic examination and apoptosis repressor with card Ab-1 cist for immunohistochemical examination. Biochemical parameters such as myeloperoxidase (MPO), TNF- α , and IL-6 were evaluated.

Results: The rate of mortality in N and S groups was significantly higher than T and C groups ($P < 0.05$). Significant weight increase was identified in C group ($P < 0.05$). There was significant decrease in T group in comparison of histopathologic values and apoptosis according to N and S groups ($P < 0.05$). T group was significantly decrease in comparison of IL-6, TNF- α , and MPO according to S and N groups ($P < 0.05$). There was no significant difference between T and C groups ($P > 0.05$).

Conclusion: Pure Ig A given orally was identified to decrease intestinal damage and to prevent NEC in experimental NEC model.

Keywords: Necrotizing Enterocolitis, treatment, Immunoglobulin A, newborn

9. KAYNAKLAR

- 1- Sanjay Patole, Prevention of necrotising enterocolitis: Year 2004 and beyond. The journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine, January 2005; 17(1):69–80.
- 2- Stephen S. Kim and Craig T. Albanese: Chapter 92 Necrotizing Enterocolitis. Jay L. Grosfeld, MD, James A, O'Neill, Jr., MD, Arnold G. Coran, Eric W. Fonkalsrud, Antony A. Caldamone, Pediatric Surgery sixth edition wolume two (July 2006); 1427-1452.
- 3- Ricketts RR, Necrotizing enterocolitis. In Reffensperger JG (eds): Swenson's Pediatric Surgery, Fifth Edition, Connecticut, Appleton & Lange, 1990; pp. 627–636.
- 4- Can Başaklar. Yenidoğanlarda gastrointestinal Kanama. Bebek ve Çocukların Cerrahi ve ürolojik hastalıklar. Ankara Palme yayıncılık, 2006. Bölüm 35. 757–783.
- 5- Eibl MM, Wolf HM, Furnkranz HM, Rosenkranz HM. Prevention of necrotizing enterocolitis in low-birth-weight infants by Iga-IgG feeding. N Eng J Med 1988; 319:1–7.
- 6- Rubaltelli FF, Benini F, Sala M. Prevention of necrotizing enterocolitis in neonates at risk by oral administration of monometric IgG. Dev Pharmacol Ther 1991;17:138-143.
- 7- Santulli TV, Schullinger JN, Heird WD. et al: Acute necrotizing enterocolitis in infancy: A review of 64 cases. Pediatrics 1975; 55: 376 -380.
- 8- Lawrence Gregor, Tudehope David, Baumann Kathryn, Jeffery H., Gill Andrew, Cole Michael, Drew John, McPhee A. J. Ratcliffe John, Reynolds Graham, Simes John, Swanson Cheryl, Cartwright David, Davis Peter, G. Humphrey Ian, Berry Andrew. Enteral human IgG for prevention of necrotising enterocolitis: a placebo-controlled, randomised trial. Lancet 2001; 357: 2090–94
- 9- D. Richter, P. Bartmann, F. Pohlandt. Prevention of necrotizing enterocolitis in extremely low birth weight infants by IgG feeding? Eur. J. Pediatr 1998; 157: 924–925
- 10- G. Schmölder, B. Urlesberger, F. Reiterer, M. Haim, J. Kutschera, B. Resch, W. Müller. Multimodal approach to prophylaxis of necrotizing enterocolitis: clinical report and review of literature. Pediatr. Surg. Int. 2006; 22 (7):573–580.
- 11- Foster J, Cole M. Oral immunoglobulin for preventing necrotizing enterocolitis in preterm and low birth-weight neonates. From The Cochrane Library, 2005 issue 2 ,
- 12- Kliegman RM, Fanarooff AA: Necrotizing enterocolitis. N Engl J Med, 1984; 310:1093–1103
- 13- Barbara Noerr, RNC, MSN, CRNP. Part 1. Current Controversies in the Understanding of necrotizing Enterocolitis. Advances in Neonatal Care, Vol 3, No 3 (june), 2003: pp 107–120
- 14- Rowe MI, Reblock, KK, Kurkchubasche AG, Healey PJ. Necrotizing enterocolitis in the extremely low birth weight infant. J pediatr Surg, 1994; .29.987.
- 15- Ricketts RR: Necrotizing enterocolitis. In Ziegler MM, Azizkhan RG, Weber TR (eds): Operative Pediatric Surgery. New York, McGraw – Hill, 2003, pp.661–670.
- 16- Kosloska AM: Necrotizing enterocolitis in the neonate. Surg Gynecol Obstet, 1979; 148: 259–269.

- 17- Kosloske AM: Pathogenesis and Prevention of Necrotizing enterocolitis: A hypothesis based on personal observation and a review of the literature. *Pediatrics*, 1984; 74,1086.
- 18- Walsh MC, Kliegman RM: Necrotizing enterocolitis: treatment based on staging criteries. *Pediatr Clin N Am*, , 1986; 33: 179.
- 19- Daver yeker Çocuk cerrahisi 37 Nekrotizan Enterokolit 2005:327
- 20- Rowe MI, Albanese CT. Necrotizing enterokolitis. In: O'Neill JA. Rowe MI, Grosfeld JL, Fonkalsrud EW, Coran AG. *Pediatric Surgery Year Book Medical Publisher, St, Louis, Mosby*, 1998; PP: 1297- 1320.
- 21- Agerty HA, Ziserman AJ, Sollenberger CL. A case of perforation of the ileum in a newborn infant with operation and recovery. *J Pediatr*, 1943; 22.233.
- 22- Rangel SJ, Moss RL: Necrotizing enterocolitis. In oldham KT, Colombani PM, Foglia RP, Skinner MA (eds): *Principles and Practice of Pediatric Surgery*, Lippincott & Williams & Wilkins, Philadelphia, 2005, pp. 1251–1267.
- 23- Teasdale F. et al: Neonatal necrotizing enterocolitis: The relationship of age at time of onset and prognosis. *Canad Med Assoc J*, 1980; 123:387.
- 24- Michael Caplan,M.D. Division of Neonatology Evanston Northwestern Healthcare, Isabelle De Plaen, M.D. Division of Neonatology Memorial Research Center 2300 Children's plaza Chicago - IL 60614 Necrotizing enterocolitis Last update 2005: 20 July.
- 25- Chan KL, Ho JCY, Chan KW, Tam PKH: A study of gut immunity to enteral endotoxin in rats of different ages: a possible cause for necrotizing enterocolitis. *J pediatr surg*, 2002; 37: 1435–1440.
- 26- Lemons J, Bauer C, Oh W, Korones S, Papile L, Stoll B, Verter J, Temprosa M, Wright L, Ehrenkranz R, Fanaroff A, Stark. A, Carlo W, Tyson J, Donovan E, Shankaran S, Stevenson D. Very low birth weight outcomes of the National Institute of Child health and human development neonatal research network, January 1995 through December 1996. *NICHD Neonatal Research Network. Pediatrics* 2001; Jan;107:E1.
- 27- Barlow B, Santulli TV, Heird WC, Pitt J, Blanc WA, ve Schullinger JN. An experimental study of acut neonatal enterocolitis: The importance of breast milk. *J Pediatr Surg*, 1974; 9.587–595.
- 28- Dickinson EC, Gorga JC, Garrett M, Tuncer R, Watkins SC, Alber SM, Parizhskaya M, Truceo M, Rowe MI, ve Ford HM: Ig A supplementation abrogates bacterial translocation and preserves the architecture of the intestinal epithelium. *Surgery*, 1998;124:284.
- 29- Buescher ES: Host defense mechansm of human milk and their relations to enteric infeclions and necrotizing enterocolitis. *Clin Perinato*, 1994;121:247.
- 30- Caplan MS, Amer M, Jilling T: The role of Polyunsaturated Fatty acid Supplementation in intestinal imflammation and neonatal necrotizing enterocolitis. *Lipids*,2001: 36,1053–1057.
- 31- Caplan MS, Catchpole RM, Kaup S, Russel T, Lickerman M, Amer M, Xiao Y, Thomson R: Bifidobacterial supplementation reduce the incidence of necrotizing in a neonatal rat model. *Gastroenterology*, 1999; 117:577–583.

- 32- Temiz A: Deneysel neonatal nekrotizan enterokolit modelinde stabil prostasiklin analogu olan iloprostun etkisi. Uzmanlık tezi. İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, İstanbul, 2001.
- 33 - Chan KL, Ho JCY, Chan KW, Tam PKH: A study of gut immunity to enteral endotoxin in rats of different ages: a possible cause for necrotizing enterocolitis. *J Pediatr surg*, 2002;37: 1435- 1440
- 34- Dvorak B, Halpern MD, Holubec H, Dvorakova K, Dominguez JA, Williams CS, Meza YG, Kazakova H, Mccuskey RS: Maternal milk reduces severity of necrotizing enterocolitis and increases intestinal IL-10 in a neonatal rat model. *Pediatr Res*,2003; 53.426–433.
- 35- Rotbart HA, Levin MJ: How contagious is necrotizing enterocolitis? *Pediatr J Infect Dis*, 1983; 2.406.
- 36- Book LS et al. Clustering necrotizing enterocolitis: interruption by infection-control methods. *N Eng J Med*, 1977: 297:984.
- 37- Ballance WA, Dahms BB, Shenker N, et al: Pathology of neo-natal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1990;117 :(Suppl)- 6–13.
- 38- Lawrence G,Bates J, Gaul A. Pathogenesis of neonatal necrotizing enterocolitis. *Lancet*, 1982; 72.317.
- 39- Harris MC et al. Cytokine elevations in critically ill infants with sepsis and necrotizing enterocolitis. *J Pediatr*, 1994;124:105
- 40- Rotbart HA, Nelson WL, Glode MP, Triffon TC, Kogut SJ, Yolken RH, Hernandez JA, Levin MJ. Neonatal rotavirus-associated necrotizing enterocolitis: case control study and prospective surveillance during an outbreak. *J Pediatr*. , 1988;112(1): 87–93.
- 41- Davis JM: Role of theophylline in pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1986;109: 344.
- 42- Jones RAK: Xanthines and necrotizing enterocolitis. *Arch Diş Chlid*56:238, 1981. enesis of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr*, 1986; 109: 344
- 43- Johnson L et Al. Relationship on prolonged pharmacologic serum levels of vitamin E to incidence of sepsis and necrotizing enterocolitis in infants with birth weight 1500 gr. or less. *Pediatrics* 1985;75.619,
- 44- Norton ME, Merrill J, Cooper BAB, et al. Neonatal complications after administration of indomethacin for preterm labor. *N Eng J Med*, 1993; 329:1602–1607
- 45- K.Uğur Özkan, B.Hayri Özokutan, Fatma İnanç, Çetin Boran, Metin Kılınç. Does maternal nicotine exposure during gestation increase he injury severty of small intestine in the newborn rats subjected to experimental necrotizing enterocolitis. *Journal of pediatric surgery*, 2005;40: 484-488
- 46- Goldman AS, Smith CW. Host resistance factors in human milk. *J Pediatr* , 1973; 83:1082-6.
- 47- Martinez-Tallo E, Claire N, Bancalari E. Necrotizing enterocolitis in full-term or near-term infants, 1997;71.292–298,

- 48- Beverly B. Dahms. The gastrointestinal Tract. J.Thomas Stocker, Louis P.Dehner. Pediatric Pathology. Second Edition. Volume one. Lippincott Williams &Wilkin. Philadelphia: 2002. Capter:15. 675–681
- 49- Touloukian RJ. Neonatal necrotizing enterocolitis: an update on etiology, diagnosis and treatment. Surg Clin North Am, 1976; 56:281
- 50- Hebra A, Brown MF, Hirschi RB. Mesenteric ischemia in hypoplastic left heart syndrome. J Pediatr Surg, 1993;28:606-611
- 51- Colli AM, Perry SB, Lock JE, Keane JF. Balloon dilation of critical valvar pulmonary stenosis in the first month of life. Cathet Cardiovasc Diagn, 1995; 34:23-8
- 52- Yu VY, Joseph R, Bajuk B, Orgill A, Astbury. Perinatal risk factors for necrotizing enterocolitis. J Arch Dis Child, 1984;59:430–4
- 53-.Park. s DA, Bulkley GB, Granger DN. Role of oxygen-derived free radicals in digestive tract diseases. Surgery, 1983:94.415.
- 54- Flores-Nava G, Joachin-Roy H, Rodriguez-Cueto G. Risk factors in neonatal necrotizing enterocolitis. Bol Med Hosp Infant Mex, 1993;50(9):645–9
- 55- Hsueh W. Caplan MS, Qu XW, Tan XD, De plaen IG, Crussi FG: neonatal necrotizing enterocolitis: Clinical considerations and pathogenetic concepts. pediatr Dev Pathol, 2002; 6:6–23
- 56- Tristram G. Parslow. Immunoglobulins & Immunoglobulin Genes. In: Tristram G. Parslow, Daniel P. Stites, Abba I. Terr, Jhon B. Imboden. Medical Immunology. a Lange medical book. Tenth edition. ,2001;Capter 7. PP: 95–114
- 57- Kaya Kılıçturgay. İmmünoloji. 3.baskı. Nobel & Güneş kitabevi. İstanbul. Bölüm 8,2003: 81–95
- 58- Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman. In Yıldız camcıoğlu, Günnur Deniz. Edinsel İmmün Sistemde Antijen Tanıma. Temel İmmünoloji. İmmün Sistemin İşlev ve Bozuklukları. İstanbul medikal yayıncılık. , 2007: 63–82
- 59- Neyzi Olcay, Ertuğrul Türkan. İmmunoglobülinler Öneş Ülker, Yalçın Işık, İmmunoloji ve Alerji Bölüm 9; Nobel Tıp,1993: 497–501
- 60- P.C.Chambe, R.A.Harvey Lippincott's illustrated rewiews.2.baskı.97.115.
- 61- Krawizs J.E., Sharon P., Stenson W.F. Quantitative assay for akut intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Gastroenterology 1984; 87: 1344–50.
- 62- Scheifele DW, Olsen E, Fussell S, Pendray M. Spontaneous endotoxemia in premature infants: Correlations with oral feeding and bowel dysfunction. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1985; 4:67-74.
- 63- Sun XM, Hsueh W. Bowel necrosis induced by tumor necrosis factor in rats is mediated by platelet-activating factor. J Clin Invest, 1988; 81:1328-1331
- 64- Muguruma K, Gray PW, Tjoelker LW, et al: The central role of PAF in necrotizing enterocolitis development. Adv Expl Med Biol,1994; 407:379–382
- 65- Caplan MS, Kelly A, Hsueh W Endotoxin and hypoxia-induced intestinal necrosis in rats: The role of platelet activating factor. Pediatr Res, 1992; 31:428-434

- 66- Kazez E, Küçükaydın N, Küçükaydın M, Konaş O, Okur H, Doğan P: A Model of hypoxia-induced necrotizing enterocolitis: the rol of distension. J pediatr surg, 1997; 32: 1466–1469
- 67- Burtis Cari, Ashwod Edward R. TietzTextbook of Clinical Chemistry. Third Edition 1999. S.541–610.
- 68- Özbal Yusuf, Temel İmmünoloji, Kayseri Nobel Tıp kitabevleri 1994; s: 103–113.
- 69- Müftüoğlu E, Bolaman Z, Blgir O, Ertop S. İmmunoloji, İzmir. Saray Tıp Kitabevleri 1993: 77–97.
- 70- Vasili P. The Pathophysiology of TNF: Ann Review of Immunology; 1992;10: s:411–452
- 71- Horii Y, Muraguchi A, Iwano M, at all. Involement of IL–6 in mesengial proliferativ golmerulonephritis. J Immunol, 1989, Dec.15;143(12): 3949–55
- 72- Male D, Champion B, Cook A, Owen M. Advanced Immnology, 1991; s:103–113.
- 73- Scheifele DW, Olsen E, Fussell S, Pendray M, Spontaneous endotoxemia in premature infants: Correlastions With oral feding and bowel dysfunction. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1985; 4.67–74
- 74- Terashita ZI, Imur Y, Nishikawa K, Sumida S, Is platelet activating factor (PAF) a mediator of endotoxin shock? Eur J Pharmacol, 1985;109: 257–61
- 75- Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF ve ark. Shock and tissue injury, induced by recombinant human cachectin. Science, 1986; 234:470–474.
- 76- Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T, Conolly RJ, Dinarello CA, Interleukin 1 induces a shock- like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. J Clin Invest, 1988;81: 1162- 1172
- 77- Caplan MS, Kelly A, Hsueh W Endotoxin and hypoxia- İnduced intestinal necrosis in rats: The role of platelet activating factor. Pediatr Res, 1992;31: 428–434
- 78- Muguruma K, Gray PW, Tjoelker LW. The central role of PAF in necrotizing enterocohitis development, Adv Expl Med Biol, 1997;407:379–382
- 79- Gonzalez- Crussi F, Hsueh W. Experimental model of ischemic bowel necrosis: The role of platelet activating factor end endotoxin. Am J Pathol, 1983; 112–127–135.
- 80- Hsueh W. Gonzalez- Crussi F, Arroyave JL. Platelet activating factor is an endogenous mediator for bowel necrosis in endotoxemia, FASEB J, 1987; 1: 403–405
- 81- Caplan MS, Sun SM, Hsueh W, Hypoxia causes ischemic bowel necrosis in rats: The role of platelet- activating factor (PAF-acether) Gastroenterol,1990;99: 979–986,
- 82- Kumar vınay, Cotran S. Ramzi, Robbins L. Stanley editör uğur Çevikbaş. Hücre zedelenmesi, adaptasyonu ve ölümü. Robbins Basic Pathology Cepter . Richard N. Mitchell, Ramzi S. Cotran. /7'ci baskı, 2003:26-28
- 83- Kumar vınay, Cotran S. Ramzi, Robbins L. Stanley editör uğur Çevikbaş. İmmün Bozukluklar. Robbins Basic Pathology Cepter 5. Richard N. Mitchell, Vınay Kumar. /7'ci baskı,2003: 102–106

- 84- Evan P Nadler, Dickinson E, Knisely A, Zhang XR, Boyle P, Beer-stolz D, Watkins SC, ve Ford HR. Expression of inducible nitric oxide synthase and interleukin-12 in experimental necrotizing enterocolitis. *J Surg Res*, 2000; 92:71-77
- 85- Dickinson EC, Gorga JC, Garrett M, Tuncer R, Watkins SC, Alber SM, Parizhskaya M, Truceo M, Rowe MI, ve Ford HM: Ig A supplementation abrogates bacterial translocation and preserves the architecture of the intestinal epithelium. *Surgery*, 1998; 124:284.
- 86- Chen W, Fu XB, Ge SL, Sun TZ, Zhou G, Han B, Du YR, Li HH, Sheng ZY. Intravenous acid fibroblast growth factor protects intestinal mucosal cells against ischemia-reperfusion injury via regulating Bcl-2/Bax expression. *World J Gastroenterol*. 2005 Jun 14;11(22):3419-25.
- 87- Nakamura H., Tsukada H., Oya M., Seino Y., Aminoguanidine has both an antiinflammatory effect on experimental colitis and a proliferative effect on colonic mucosal cell. *Scand J Gastroenterol* 1999; 11
- 88- Bradley et al. (1982) *J. Invest. Dermatology* 78, 206-209.
- 89- Karen D. Crissinger. Animal model of necrotizing enterocolitis. *Journal of pediatric Gastroenterology and nutrition*, 1995; 20: 17-22
- 90- Clark. DA, Thompson JE, Weiner LB, Mc Millan JA, Schneider AJ, Rokahr JE. Necrotizing enterocolitis: Intraluminal biochemistry in human neonates and a rabbit model. *Pediatr Res* 1985; 19: 919-21
- 91- Miller MJS, Adams J, Gu X, Zhang XJ, Clark. DA. Hemodynamic and permeability characteristics Of acute experimental necrotizing enterocolitis. *Dig Dis Sci* 1990; 35: 1257-64
- 92-- Snyder F. Platelet-activating factor and related acetylated lipids as potent biologically active cellular mediators. *Am J Physiol* 1990; 259: C697-708.
- 93- W Hsueh, MS Caplan, X Sun, X Tan, W Mackendrick and Gonzalez-Crussi. Platelet-activating factor, tumor necrosis factor, hypoxia and necrotizing enterocolitis. *Acta Pediatr Suppl*, 1994; 396: 11-17
- 94- R. Zamora, Y. Vodovotz, H.R. Ford and J.S. Upperman. Plasma cytokine levels in experimental necrotizing enterocolitis: a mathematical model is needed. *Journal of Critical Care*. 2005: Volume 20, Issue 4 December, Page: 397
- 95- Grisman MB, Benoit JN, Granger DN, Assessment of leukocyte involvement during ischemia and reperfusion of intestinal. *Methods Enzymol* 1990; 186: 729-42
- 96- İnci Alican, E. Erol Ünlüer, Cumhuriyet Yeğen, Berrak Ç, Yeğen. Bombesin Improves burn-induced intestinal injury in the rat. *peptides* 2000; 21:1265-1269
- 97- By Henri Ford, Simon Watkins, Kimberly Reblock, and Marc Rowe. The Role of Inflammatory Cytokines and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Necrotizing Enterocolitis. *Journal of Pediatric Surgery*, Vol 32, No 2 (February), 1997: pp 275-282
- 98- Papaconstantinou HT, Hwang KO, Rajavaman S, Hellmich MR, Townsend CM, Irg Ko TC. Glutamine deprivation induces apoptosis in intestinal epithelial cells. *Surgery*, 1998;124:152-8

- 99- By Joy L. Graf, Karen J. VanderWall, N. Scott Adzick, and Michael R.Harrison. Nitroglycerin Attenuates the Bowal Damage of Necrotizing Enterocolitis in a Rabbit model. *Journal of Pediatric Surgery*, Vol 32, No 2 (February), 1997: pp 283- 286.
- 100- Seitz G, Warmann SW, Guglielmetti A, Heitmann H, Ruck P, Kreis ME, Fuchs J. Protective effect of tumor necrosis factor alpha antibody on experimental necrotizing enterocolitis in the rat. *Journal of Pediatric Surgery*, 2005; 40: 1440–1445
- 101- Uguralp S, Mizrak B, Karabulut AB, Gürbüz N, Demircan M. Interferon-alpha reduces the development of experimental necrotizing enterocolitis. *Cytokine*. 2004 Mar 7;25(5):204–211.
- 102- By Daniel J. Ledbetter and Sandra E.Juul. Erythropoietin and the Incidance of Necrotizing Enterocolitis in Infants With very Low Birth Weight. *Journal of Pediatric Surgery*, vol 35, No 2 (February), 2000: pp 178–182
- 103- Dvorak B, Halpern MD, Holubec H, Williams CS, McWilliam DL, Dominguez JA, Stepankova R, Payne CM, McCuskey RS.Epidermal growth factor reduces the development of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002 Jan;282(1):G156–64
- 104- Cellini C, Xu J, Arriaga A, Buchmiller-Crair TL.Effect of epidermal growth factor infusion on fetal rabbit intrauterine growth retardation and small intestinal development. *J Pediatr Surg*. 2004 Jun;39(6):891–7.
- 105- Zhang BH, Yu HG, Sheng ZX, Luo HS, Yu JP. The therapeutic effect of recombinant human trefoil factor 3 on hypoxia-induced necrotizing enterocolitis in immature rat.*Regul Pept*. 2003 Nov 15;116(1–3):53–60.
- 106- Canpolat FE, Yurdakök M, Korkmaz A, Yiğit S, Tekinalp G. Enteral granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of mild (stage I) necrotizing enterocolitis: a placebo-controlled pilot study.*J Pediatr Surg*. 2006 Jun;41(6):1134–8.
- 107- Çiftci İlhan, Dilsiz Alâeddin. Deneysel Nekrotizan Enterokolit Modelinde Selektif Ve Nonselektif Nitrik Oksit Sentaz Enzim İnhibitörlerinin İntestinal Hasara Etkisi (Uzmanlık tez). Konya S. Ü. Tıp Fakültesi, 2002.
- 108- Marion C. W. Henry and R. Lawrence Moss. Current Issues in the Management of Necrotizing Enterolitis. *Seminars in Perinatology*, vol 28, No 3 (june), 2004: pp 221–233.
- 109- B Garzon, R Ducroc and JP Geloso. Ontogenesis of gastric acid secretion in fetal rat. *Pediatric Research*, Vol 15, 1981: 921–925.
- 110– Dinçer Yıldıztaş, Hacer Yapıcıoğlu, Gökhan Tümgör, Fatih Erbay. Çocuk yoğun bakım ünite’sindev sepsis nedeni ile izlenen hastalarda poliklonal intravenoz immünglobülin tedavisi mortaliteyi azaltıyormu? *Çocuk Sağlığı ve hastalıkları dergisi*. 2005 Cilt 48, Sayı 2; 1-4
- 111- R. Sharma, R. Garrison, J. Tepas III, D. Mollitt, Pam Pieper, M. Hudak, P. Wludyka, J. Bradshaw, Gray Stevens, and Bangalore R. Premachandra. Rotavirus-associated necrotizing enterocolitis: an insight into a potentially preventable disease?. *Journal of Pediatric Surgery*

(2004) Volume 39, Issue 3, Pages 453–457.

- 112- Hung-Chih Lin, Bai-Horng Su, An-Chyi Chen, Tsung-Wen Lin, Chang-Hai Tsai, Tsu-Fuh Yeh, and William Oh, Oral Probiotics Reduce the Incidence and Severity of Necrotizing Enterocolitis in Very Low Birth Weight Infants. *Pediatrics* Vol. 115 No. 1 January 2005, pp. 1-4 .
- 113- A. Bin-Nun, R. Bromiker, M. Wilschanski, M. Kaplan, B. Rudensky, M. Caplan, C. Hammerman Oral Probiotics Prevent Necrotizing Enterocolitis in Very Low Birth Weight Neonates. *The Journal of Pediatrics*, Volume 147, Issue 2, Pages 192–196
- 114- Lin H, Su B, Chen A, Lin Tw, Tsai C, Yeh T, et al Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics* 2005; 115: 1–4.
- 115- Wolf HM, Eibl MM. The anti-inflammatory effect of an oral immunoglobulin (IgA-IgG) Preparation and its possible relevance for the prevention of necrotizing enterocolitis. *Acta paediatr suppl* 1994 396,37–40.
- 116- Ben L. Zarzuar, Yong Wu, Kazuhiko Fukatsu, Cheryl D. Jhonson and Kenneth A. Kudsk, Memphis, Tenn. The neuropeptide bombesin improves IgA-mediated mucosal immunity with preservation of gut interleukin–4 in total parenteral nutrition-fed mice. *Surgery* Januar 2002; Volume 131: 59–65
- 117- Sangild Per T. , Siggers Richard H. , Schmidt Mette, Elnif Jan, Bjornvad Charlotte R. , Thymann Thomas, Grondahl Marie L., Hansen Axel K. , Jensen Soeren K. , Boye Mette , Moelbak Lars , Buddington Randal K. , Westrom Björn R. , Holst Jens J. And Burrin Douglas G. Diet- and colonization-dependent intestinal dysfunction predisposes to necrotizing enterocolitis in preterm pigs. *Gastroenterology* May 2006; Volume 130, issue 6, Pages 1776–1792.

TEŞEKKÜR

Asistanlık sürem boyunca bizlere bilgi ve tecrübeleri ile ışık tutan tüm hocalarıma, tez hocam Prof. Dr. Engin GÜNEL'e, Prof. Dr. Adnan ABASIYANIK, Yrd. Doç. Dr. Alaeddin DİLSİZ ve Yrd. Doç. Dr. Müslim YURTÇU hocamıza, Biyokimyasal çalışmaları yapan Prof.Dr. Mehmet GÜRBİLEK ve Dr.Seval AKBULUT'a, patolojik incelemeyi yapan Yrd. Doç.Dr. Hatice TOY'a, istatistiksel çalışmadaki katkılarından dolayı Prof. Dr. Kemal Tahir ŞAHİN'e, ratların özenli bakımını yapan ve deneysel çalışmada yardımcı olan Veteriner Hekim Mehmet ÖZ'e ve hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen Dr.Ahmet DUYMAZ'a teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Ayrıca uzmanlık eğitimim süresince beraber çalıştığım asistan arkadaşlarıma, Çocuk Cerrahisi Kliniği'nin tüm hemşire ve personeline, maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ailem, yakınlarıma ve özellikle hiç unutamayacağım eşime sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Bahattin AYDOĞDU

Konya-2007