

T.C.

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI



DENEYSEL NEKROTİZAN ENTEROKOLİT MODELİNDE AMNİON SIVISI
VE SİTOKİNLERİN NEKROTİZAN ENTEROKOLİT İLE İLİŞKİSİ

TEZ YÖNETİCİSİ

DOÇ. DR. ŞEREF OLGAR

DR. MUHAMMED ÜDÜRGÜCÜ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

KAHRAMANMARAŞ

2013

T.C.

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI



DENEYSEL NEKROTİZAN ENTEROKOLİT MODELİNDE AMNİON SIVISI
VE SİTOKİNLERİN NEKROTİZAN ENTEROKOLİT İLE İLİŞKİSİ

TEZ YÖNETİCİSİ

DOÇ. DR. ŞEREF OLGAR

DR. MUHAMMED ÜDÜRGÜCÜ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

KAHRAMANMARAŞ

2013

2012/5/10 no'lu bu Proje KSÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Eğitimimiz boyunca bilgi ve becerisi ile gelişmemizde büyük emeği olan, günün 24 saati en ufak konuyu bile danışmak için rahatlıkla aradığımız ve muhtemelen aramaya devam edeceğimiz, tez hazırlama sürecimde de her aşamada sabırla her türlü desteği esirgemeyen değerli hocam, sayın Doç. Dr. Şeref Olgar'a; otoriter ve disiplinli kişiliği, tecrübesi, yol göstericiliği ile örnek aldığımız, değerli hocam, Anabilim dalı başkanımız, sayın Prof. Dr. Cengiz Dilber'e; eğitici ve sabırlı olmasının yanında, paramedikal alanda da bilgi ve tecrübelerini paylaşmasından keyif aldığımız değerli hocam, sayın Doç. Dr. Ekrem Güler'e; bilgisi, zekası ile yardımını esirgemeyen, sadece hastalara değil, tüm canlılara karşı merhamet dolu olan, güler yüzlü hocam, sayın Doç. Dr. Mehmet Davutoğlu'na; renkli kişiliği, hoşgörüsü, üstün zekası ile eğitimimizde büyük katkıları olan, bakış açımızı genişleten değerli hocam, sayın Doç. Dr. Mesut Garipardıç'a;

İhtisas eğitimim boyunca güzel anılarımız olan Uzm. Dr. M. Deniz Erhan, Uzm. Dr. Halil Gürsoy, Uzm. Dr. Veysel Sümer, Uzm. Dr. Naime Tokur, Uzm. Dr. Ümit Korkmaz, Uzm. Dr. Aslı Mutlugün, Uzm. Dr. Ayşe Benlidayı Yılmaz, Uzm. Dr. Esen Cabioglu İspiroğlu, Uzm. Dr. Adem Saydam, Uzm. Dr. Tahir Dalkıran, Dr. Esra Bebek, Dr. Emre Özdamar, Dr. Tuba Seferoğlu, Dr. Oya Kireker Köylü, Dr. Nihal Karabel, Dr. Yalçın Göksugür, Dr. Kadir Söylemez, Dr. Elif Tepe, Dr. Ali Rıza Namlı, Dr. Derya Cevizli, Dr. Burcu Cantay, Dr. Kübra İrday, Dr. Fatih Karaokur, Dr. Fatma Zehra Halhallı Kılıç, Dr. Pınar Kesik, Dr. Tuba Leblebici'ye;

Bugüne kadar yetişmemde her türlü fedakarlığı yapan, her türlü sıkıntıma katlanan ve her zaman minnettar olduğum babam Mustafa Metin Üdürgücü, annem Müzeyyen Üdürgücü, kardeşlerim ve eşim Hatice Üdürgücü'ye teşekkürü borç bilirim.

Dr Muhammed Üdürgücü

Kahramanmaraş

Mart 2013

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iii
TABLolar DİZİNİ	iv
GRAFİKLER DİZİNİ	v
KISALTMALAR	vi
ÖZET	viii
ABSTRACT	x
1 GİRİŞ ve AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 NEKROTİZAN ENTEROKOLİT	3
2.1.1 Patogenez	3
2.1.2 Risk Faktörleri	25
2.1.2.1 Prematurite ve Düşük Doğum Ağırlığı	25
2.1.2.2 Enteral Beslenme	26
2.1.2.3 Bakteriyel Kolonizasyon	26
2.1.2.4 Hipoksik İskemik Durumlar	27
2.1.3 Klinik	27
2.1.4 Evreleme	28
2.1.5 Tanı	29
2.1.6 Tedavi	31
2.1.7 Korunma	33
3 MATERYAL ve METOD	36
4 BULGULAR	46
5 TARTIŞMA	58
5.1 SONUÇ ve ÖNERİLER	69
6 KAYNAKLAR	76
7 EKLER	95

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 ve 2.2.	İntestinal yüzeyin korunmasında ve emilimin düzenlenmesinde etkileri olan “unstirred layer” şematik olarak gösterilmektedir	8
Şekil 2.3.	İntestinal yüzeyde yer alan M hücreleri, Peyer plakları ve antijene karşı oluşturulan immun yanıt şema ile gösterilmektedir	9
Şekil 2.4	TPN ile ilişkili problemler	12
Şekil 2.5	TLR Aktivasyonu ve enflamatur yanıtın düzenlenmesi	17
Şekil 2.6	TNF- α 'nın sinyal yolları	21
Şekil 2.7	Enflamatur kaskad toksik metabolitlerin üretimi ile intestinal mukozaya zarar veren çok sayıda proenflamatur ve düzenleyici sitokinlerin salınımı.	21
Şekil 2.8	Nekrotizan enterokolitte hipoksi, formula ile beslenme ve bakteri çoğalması ile aktive olan enflamatur kaskad; doku iskemisi ve nekrozu	22
Şekil 2.9	Lateral grafide intestinal perforasyon gelişen NEK vakasında batın içi serbest gaz görülmektedir	31
Şekil 3.1	Doğumdan hemen sonra yenidoğan sıçanlar görülmektedir.	38
Şekil 3.2	Hipoksi oluşturmada kullanılan aspiratör ve nitrojen gazı.	39
Şekil 3.3 ve 3.4	Hipoksi öncesi (solda) ve sonrası (sağda) yavrular görülmektedir. Yavrularda siyanoze renk değişikliği dikkat çekmektedir.	39
Şekil 3.5	Beslemelerde kullanılan insulin enjektörü ve intraket ucu.	40
Şekil 4.1	Solda formula mama ile beslenen, sağda anne sütü ile beslenen ikişer yavru görülmektedir. Soldakilerin karın çevrelerinin artmış olduğu, karın cilt renklerinin koyulaşmış olduğu ve daha hipoaktif olan yavruların genel durumlarının daha kötü olduğu dikkat çekmektedir.	49
Şekil 4.2	Amnion sıvısı ile hazırlanmış formula mama ile beslenen bir yavrunun 32. saatte çekilmiş fotoğrafı görülmektedir. Hipotonik olan yavrunun artmış batın çevresi ve koyulaşmış cilt rengi dikkat çekmektedir.	49
Şekil 4.3	Anne sütü ile beslenen yavrunun çıkarılan bağırsağı	53
Şekil 4.4	Formula mama ile beslenen yavrunun çıkarılan bağırsağı. Koyu renkli, kalınlaşmış, ödemli ve olası nekroze bölgeler görülmektedir.	54

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1	NEK evrelemede kullanılan Bell kriterleri	29
Tablo 3.1	Beslenme içeriklerine göre grupların özellikleri	36
Tablo 3.2	Gruplara dahil edilme ve çıkarılma kriterleri	37
Tablo 3.3	Histopatolojik evreleme	42
Tablo 4.1	Gruplara göre deneklerin vücut ağırlıkları, yaşam süreleri ve intestinal perforasyon sıklıkları	46
Tablo 4.2	Beslenmelerde kullanılan amnion sıvısına ait biyokimyasal tetkikleri ve hücre sayımı	47
Tablo 4.3	Beslenmelerde kullanılan formula mamasının içerik bilgileri	48
Tablo 4.4	Gruplara göre NEK'in patolojik evrelemesi	54
Tablo 4.5	Gruplara göre enflamatuvar ve oksidan parametrelerin ortalama değerleri	57

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 4.1a, 4.1b, 4.1c	Sırasıyla doğumda, birinci ve ikinci gün sonlarında gruplara göre deneklerin ağırlıkları kıyaslanmaktadır.	50
Grafik 4.2a ve 4.2b	Üçüncü ve dördüncü gün sonlarında G1 ve G2 deneklerinin ağırlıkları kıyaslanmaktadır.	50
Grafik 4.3	Grupların ortalama yaşam süreleri görülmektedir.	51
Grafik 4.4	Gruplara göre histopatolojik evreleme	55

KISALTMALAR DİZİNİ

AMP	Adenozin Monofosfat
CAT	Katalaz
CRH	Kortikotropin Salıcı Hormon
CRP	C-Reaktif Protein
DIC	Dissemine İntravaskuler Koagulasyon
DNA	Deoksiribonukleik Asit
EDRF	Endotel Kaynaklı Gevşetici Faktör
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
ET-1	Endotelin-1
FGF-2	Fibroblast Büyüme Faktörü-2
G-CSF	Granulosit-Koloni Stimulan Faktör
GM-CSF	Granulosit Makrofaj-Koloni Stimulan Faktör
GPx	Glutadyon Peroksidaz
HbA	Hemoglobin A
HbF	Hemoglobin F
HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü
HIF-1 α	Hipoksi ile İndüklenen Faktör-1 α
IgA	İmmunglobulin A
IgG	İmmunglobulin G
IFN- γ	İnterferon gamma
IGF-1	İnsulin Benzeri Growth Faktör-1
I κ -B	İnhibitor Kappa-B
IL-1 α	İnterlökin-1 alfa
IL-1 β	İnterlökin-1 beta
IL-1 γ	İnterlökin-1 gamma
IL-6	İnterlökin-6
IL-8	İnterlökin-8
IL-10	İnterlöki n-10
IL-12	İnterlökin-12
IL-18	İnterlökin-18
IL-23	İnterlökin-23

MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MDA	Malondialdehit
MHC	Major Histocompability Complex
MMP	Matriks Metalloproteinaz
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
NEK	Nekrotizan Enterokolit
NF- κ	Nukleer Faktör- κ
NK	Natural Killer
NO	Nitrik Oksit
PAF	Platelet Aktive Edici Faktör
PAFr	Platelet Aktive Edici Faktör Reseptör
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDA	Patent Ductus Arteriosus
SİP	Spontan İntestinal Perforasyon
SIRS	Sistemik Enflamatuar Yanıt Sendromu
SOD	Superoksit Dismutaz
SODD	Silencer of Death Domains
SOR	Serbest Oksijen Radikalleri
TACE	Tümör Nekroz Faktör alfa Dönüştürücü Enzim
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TLR	Tool Like Reseptor
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör alfa
TNF-R	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü
TPN	Total Parenteral Nutrisyon
TRADD	Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1 Associated Death Domain Protein
USG	Ultrasound
VEGF	Vaskuler Endotelyal Growth Factor

ÖZET

Nekrotizan enterokolit (NEK) prematür bebekleri ve yenidoğanları etkileyen, gastrointestinal sistemin ciddi bir hastalığıdır. Son yıllarda in-vitro fertilizasyon yöntemlerinin gelişmesiyle preterm doğumlarla birlikte bu hastalığın da sıklığı artmıştır. Patogenezi yeterince bilinmemektedir, ancak enteral beslenme, bakteriyel kolonizasyon, prematürite, düşük doğum ağırlığı ve hipoksik-iskemik durumlar şüphelenilen risk faktörleridir. Fetal dönemde bu faktörlere maruz kalırsa da yutulan amnion sıvısının önleyici rolü ile bebekler NEK'ten korunmakta, NEK bulguları görülmemektedir. Buna göre, gastrointestinal sistem gelişiminde etkileri olan amnion sıvısının deneysel NEK modelinde etkilerini incelemeyi planladık. Bu amaçla, sıçan yavruları hipoksi-hipotermi geliştirilen modele göre 5 gruba ayrıldı. Grupların dördüne hipoksi-hipotermi uygulandı ve anne sütü ile beslenen (G₂), amnion sıvısı ile beslenen (G₃), formula ile beslenen (G₄), amnion sıvısı ile hazırlanan formula ile beslenen (G₅) gruplar kontrol grubu (G₁) ile kıyaslandı.

Deneyin 96. saatinde tüm hayvanlar “sacrifiye” edildi ve çalışma sonlandırıldı. Histopatolojik inceleme için bağırsak örnekleri alındı ve kalan bağırsak kısımlarından doku homojenatı elde edildi. Homojenat örneklerinden sekonder enfeksiyonların incelenmesi için CRP, oksidan-antioksidan stres için MDA, SOD, CAT ve GPx, enflamasyon için GM-CSF, TNF- α , IL-8 ve vasküler hasarın tespiti için VEGF ve ET-1 düzeyleri değerlendirildi.

Hipoksi-hipotermi stresi uygulanan ve anne sütü ile beslenen yavrularda (G₂) NEK gelişimine ait bulgular ve perforasyon gözlemlenmedi. Bu durum anne sütünün koruyucu etkisine bağlandı. Ancak, diğer gruplarda perforasyon ve NEK bulguları gelişti. Amnion sıvısı ile beslenen yavruların (G₃) formula mama ile beslenenlerden daha kısa yaşadığı tespit edildi. Azalmış bu yaşam süresi amnion sıvısının düşük enerji ve protein içermesine bağlandı, intestinal perforasyon ise G₄ yavrularına göre daha seyrek saptandı. Bununla birlikte G₄ yavrularında perforasyon daha sıkı ve NEK bulguları daha şiddetli idi. Bu değişiklikler amnion sıvısının bağırsak lümeninde mukosilyer bariyeri koruyucu rol oynaması, oksidatif stresi azaltması, antioksidan görev yapması, enflamasyonu azaltması ve vaskulogenezisi etkileyerek remodelingi artırması ile düşük solüt yüküne bağlandı.

Sonuç olarak bu çalışmada, enerji ve protein içeriğinden fakir olan amnion sıvısının formula mama ile birlikte yenidoğan sıçanlara verilmesiyle bağırsak perforasyonu ve NEK gelişim sıklığının azaldığını gösterdik. Amnion sıvısının formula mama ile verilebilmesi için steril olarak toplanması, mikrobiyal ajanlar ve verniks kazeozadan arındırılması ve her yenidoğanın kendi amnion sıvısının muhafaza edilmesi ve daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Nekrotizan Enterokolit, Amnion Sıvısı, Tümör Nekroz faktör-alfa, İnterlökin-8, Vaskuler Endotelyal Growth Faktör, Endotelin-1, Granulosit Makrofaj-Koloni Stimulan Faktör, Malondialdehit, Speroksit Dismutaz, Katalaz, Glutadyon Peroksidaz

ABSTRACT

Necrotizing enterocolitis (NEC) is a serious disease that affects gastrointestinal tract of premature infants and newborns. During the recent years, the development of in-vitro fertilization methods caused preterm birth frequency and disease rate. The pathogenesis of this disease is not known enough, however as risk factors for the disease are enteral nutrition, bacterial colonization, prematurity, low birth weight, and hypoxic-ischemic conditions are suspected risk factors. Despite exposure to these factors in the fetal period the NEC signs are not seen because the swallowed amniotic fluid has a preventive role and protects the baby from NEC. Besides this, it causes gastrointestinal tract development and we aimed to investigate the effects of amniotic fluid on experimental NEC model. For this purpose, 5 groups of rat pups were examined by hypothermia-hypoxia developed model. Four groups of newborn rats were exposed to hypothermia-hypoxia and were fed with breast milk (G₂), amniotic fluid (G₃), formula (G₄), prepared with amniotic fluid formula (G₅) and were compared with control groups (G₁).

At the 96th hour of the experiment model all animals were sacrificed and the study was terminated. An intestinal sample was taken for histopathologic examination and the remaining segment of the intestine was homogenated. The homogenated samples were examined for secondary infections by CRP, for oxidative-antioxidative stress by MDA, SOD, CAT and GPx, for inflammation by GM-CSF, TNF- α , IL-8 and for vascular damage evaluation by VEGF and ET-1 levels analyzes.

There weren't NEC development signs and perforation findings at hypoxic-hypothermic stress induced and breast fed pups (G₂). This condition was connected to protective effect of breastfeeding. However, perforation and necrotizing enterocolitis signs developed in the other groups. It was noticed that amniotic fluid fed pups (G₃) lived shorter than formula fed pups (G₄). This short life span was connected to low energy and protein content of amniotic fluid but the intestinal perforation rate was lower than G₄ pups'. In addition, the NEC signs of G₃ were less and were not as severe as G₄'s. However, more perforation was observed in G₄ pups and NEC findings were more serious. When the pups were fed by the formula mixed with amniotic fluid (G₅) the intestinal perforation rate decreased and NEC findings weren't severe as G₄. These

changes connected to amniotic fluid protecting role of mucociliary barrier at bowel lumen, reduced oxidative stress, perform antioxidant tasks, reduce inflammation and increase remodeling by affecting the vasculogenesis with low solute load.

As a result of this study, we showed that poor energy and protein content amniotic fluid used combined with formula feeding newborn rats reduced bowel perforation and NEC development rate. For using amniotic fluid combined with formula, amniotic fluid should be sterile collected, separated from microbial agents and vernix caseosa and kept its own amniotic fluid of each newborns, and more extensive studies are needed.

Key Words: Necrotising Enterocolitis, Amniotic Fluid, TNF- α , Interleukin-8, Vascular Endothelial Growth Factor, Endothelin-1, Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor, Malondialdehyde, Superoxide Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nekrotizan enterokolit (NEK) yenidoğan döneminde hayatı en sık tehdit eden gastrointestinal sistemin ve özellikle bağırsağın çeşitli derecelerde transmural veya mukozal nekrozlarıyla karakterize bir hastalıdır (1). Hastalığın kesin nedeni tam olarak gösterilmemekle birlikte multifaktöriyel olduğu düşünülmektedir (1).

Yüksek mortalite ve morbiditeye sahip olan bu hastalığın dünya çapında prematür bebeklerin %2.6-28'inde görüldüğü bildirilmektedir (2). Prematürite tanısıyla yenidoğan yoğun bakım ünitelerine yatırılan hastaların %1-7.7'sinde NEK geliştiği ve NEK tanısı almış hastaların da %90'ının prematür bebeklerden oluştuğu gösterilmiştir (2). Azalan doğum ağırlığı ve gestasyonel yaşla hastalığın hem insidansı hem de vaka ölüm oranı artmaktadır (1).

Yapılan bir çalışmada 1500 gramın altında doğan prematüre bebeklerin %10'unun NEK'ten etkilendiği gösterilmiştir (3). Hastalığın özellikle doğumdan sonraki 7-14. günlerde sıklığı artarken özellikle düşük doğum ağırlığına sahip bebeklerde daha geç dönemlerde de NEK geliştiği bildirilmiştir. Olgunlaşmasını tamamlamamış bağırsak dokusunun önemli bir risk faktörü olduğu ve immaturitenin derecesi ile bu riskin arttığı ileri sürülmektedir (3).

Hastalığın etyolojisi multifaktöriyel olmasına karşın, NEK gelişimi başlıca gastrointestinal immatürite, mama ile yüksek osmotik beslenme, bakteriyel invazyon ve hipoksik iskemik durumlara bağlanmaktadır (2). İntrauterin dönemde birçok stres ve iskemiye zemin hazırlayan faktörlerin varlığına karşın (düşük sistemik oksijen saturasyonu, hidrops fetalis, ciddi taşiaritmi ve bradikardiler, annenin hipotansif durumlarının yoğunluğu gibi) intrauterin dönemde bebeklerde NEK bulguları ortaya çıkmamaktadır. Bu streslerin varlığına karşın intrauterin dönemde NEK sıklığının az olması, olası koruyucu faktörlerin (hemoglobin F, 2.3 DPG vb) yoğunluğuna bağlı olabileceği düşünülmektedir (4). Hatta intrauterin dönemdeki ciddi iskemik durumlarda bile (hidrops fetalis, dekolman plasenta, vb.) bağırsak perforasyonu ve diğer NEK bulgularıyla nadiren karşılaşmaktadır (4).

Kritik hastalık veya prematurite gibi nedenlerle oral beslenmesi sakıncalı olan bebeklere amnion sıvısına (AS) benzetilmiş sıvıların “simulated amniotic fluid” enteral verilmesiyle beslenememeye bağlı gastrointestinal sistemde gelişen olumsuz değişikliklerin azaltılabileceği fikri daha önce ileri sürülmüştür (5). Fakat literatürde daha önce yapılmış deneysel veya klinik çalışmalarda AS'nın direkt ve beslenme programına eklenerek NEK üzerindeki etkilerinin incelendiği bir araştırmaya rastlanamadı.

Yenidoğan dönemindeki NEK gelişiminin önlenmesinde diğer faktörlerle birlikte AS'nın ve içeriğindeki koruyucu ajanlarının rolü olduğuna inanmaktayız. Bu çalışmada deneysel sıçan modelinde NEK oluşturularak oral verilen AS ve AS ile desteklenmiş beslenme yöntemlerinin hastalığın seyri ve şiddetine etkilerinin klinik, sitolojik ve patolojik olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 NEKROTİZAN ENTEROKOLİT

2.1.1 Patogenez

NEK patofizyolojisi yeterince anlaşılammış olmasına karşın, multifaktöriyel olduğuna inanılmaktadır. Hastalık etyolojisinde ileri sürülen prematurite, bağırsak immatüritesi, hipoksik olaylar, perinatal veya postnatal hipoperfüzyon, formula ile beslenme, patojen bakterilerin kolonizasyonu gibi hazırlayıcı faktörler olsa da, asıl patolojinin proenflamatuar sitokinlerin salınımı ile ortaya çıkan bağırsak enflamasyonu olduğu bilinmektedir (2).

Miadında doğan bebeklerde de NEK görüldüğü bilinmektedir. Bu vakalarda NEK gelişmesinin; doğum afiksisi, polisitemi, kan değişimi, intrauterin gelişme geriliği veya siyanotik konjenital kalp hastalığı gibi bağırsak perfüzyonunu olumsuz etkileyen risk faktörlerinden kaynaklandığı gösterilmiştir. Fakat miadında doğan bebeklerdeki NEK kliniği sıklıkla prematürlerden farklı olarak ilk gün ortaya çıkmaktadır. Bu bulgudan yola çıkarak miadında doğan bebeklerdeki NEK patofizyolojisinin prematürlerden farklı olabileceği ileri sürülmektedir (3). Ayrıca pretermelerde en sık tutulum yeri jejunum ve ileum olarak bildirilirken, termelerde ise en sık kolonun etkilendiği ileri sürülmüştür (6). İleoçekal bölgenin sık etkilenmesinin nedeni proksimal bağırsağın dolaşımını sağlayan süperior mesenterik arterin ileokolik dallarının bu bölgeye olan uzaklığına bağlanmıştır (6,7). NEK gelişen vakalarda yapılan çalışmalarda, olguların yaklaşık yarısında nekrozun hem kalın hem de ince bağırsakları etkilediği, lezyonların eşit uzunlukta segmental ya da komplet tutulumlar şeklinde olduğu saptanmıştır (7) .

Şiddetli anoksik ve hipotansif gibi durumlarda kan akımının karın içi organlarının yerine, kalp ve beyin yönüne iletilmesi “dalış refleksi” olarak bilinmektedir. Bunun da yenidoğanlardaki NEK patogenezinden sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir. Hayvanlarda birçok deneysel çalışmayla dalış refleksinin rolü gösterilmiş olmasına karşın nekrotizan enterokolitteki rolü yeterince tespit edilememiştir (7).

Gastrointestinal sistem epiteli sekretuar goblet hücreleri tarafından sentezlenen, ağırlıklı olarak müsin glikoproteinlerinden oluşan, koruyucu mukus jel tabakası ile kaplanmıştır. Bu mukus tabakasının bakterilere karşı bağırsağın ilk anatomik bariyeri olduğu kabul edilmektedir (8). Bu müsin salgılayan goblet hücre fonksiyonlarının ve intestinal mukus bileşiminin çeşitli durumlarda farklılık gösterdikleri bildirilmektedir (8). Bu mukus tabakası lümen içeriği ve epitelyum arasında; koruma, kayganlaştırma ve transport fonksiyonları için gerekli görülmektedir (9). Mukusun viskoelastik polimer benzeri özelliklerini, müsin denilen yüksek glikoprotein içerikli bileşeni sağlamaktadır (9). Müsin, glikolize ve nonglikolize alanlar içeren peptid yapılı bir polimerdir. Bu polimerin, N-asetilglukozamin, N-asetilgalaktozamin, fukoz ve galaktoz oligosakkaritlerinden oluştuğu bilinmektedir (9). Bu oligosakkarit zincirleri nötral pH'da sıklıkla sialik asit veya sülfat gruplarıyla sonlanmakta olup (9), membrana bağlı spesifik glikoziltransferaz ile müsinine bağlanır. Ayrıca, golgi aparatında bulunan, Golgi sulfotransferaz enzimi nükleotid şeker vericilerinden monosakkaritleri alarak sülfat ucundan zincire aktarır (10).

Sekretuar müsin apikal yüzeyden iki farklı mekanizma ile sekrete edilir; bazal sekresyon ve birleşik ekzositoz. Bazal sekresyon; veya basit ekzositoz, yeni sentezlenen müsinin apikal granül kitlesi şeklinde lümen serbest bırakılmasıdır (9). Birleşik ekzositozda ise; müsin sekresyonu sırasında goblet hücreleri birleşik ekzositoza giderler, böylece hücrelerin merkezinde depolanmış olan müsin granülleri hızlıca lümen sekrete edilir (9). Hormonlar, nöropeptidler, sitokin ve lipid yapılı enflamatuar mediatör gibi çok sayıda biyoaktif faktörün birleşik ekzositozu etkileyebileceği bildirilmektedir (8).

Total parenteral beslenme gerektiren durumlar, intestinal ve beslenme ilişkili enfeksiyonlar, enflamatuar bağırsak hastalıkları ve kolon kanseri gibi çeşitli mukusla ilişkili olan değişikliklerde, özellikle mukusta yaşayan kommensal bakteriler olmak üzere mikropların mukus jel tabakasının gelişimini ve korunmasında etkili oldukları üzerine çalışmalar mevcuttur (8).

Assendan kolondan başlamak üzere mukus kalınlığının giderek artış gösterdiği; hatta rektumda 285 mikron kalınlığa ulaşabildiği bildirilmektedir (11). İnce bağırsak ise, daha ince ve yer yer devamsız özellikte mukus tabakası ile kaplanmıştır. Örneğin

immunolojik yapıları, antijenik maddeleri tanıyıp örnekleyen Peyer plaklarının mukus ile kaplı olmadığı bildirilmektedir (8).

Müsinler, nötral ve asidik müsinler olarak iki alt tipe ayrılmıştır. Ayrıca sialomüsinler ve sülfomüsinler olarak da tanımlanmaktadırlar. Nötral müsinler gastrik mukozada baskın iken, asidik müsinler ise ince ve kalın bağırsak epitelinde hakimdir (12). Asidik müsinin, bakteriyel glikozidaz ve proteazlara karşı sülfatlı müsinler içermesinden dolayı daha dayanıklı olduğu ve bakteriyel translokasyona karşı koruyucu etkisi olabileceği ileri sürülmektedir. Bu, mikropların daha yoğun olduğu intestinal bölgelerde goblet hücrelerinin asidik müsin eksprese etmeleriyle açıklanmaktadır (13). Fetal yaşam boyunca asidik müsinin daha baskın olduğu bildirilmektedir. Müsin sülfatasyonunun fetal kolonda 14. haftada goblet hücrelerinin belirmesiyle başlamakta olduğu, O-asetillenmiş sialomüsinlerin ise 23. haftada görünür hale geldiği gösterilmiştir (14). Doğumda insan kolonundaki müsin profilinin yetişkin insandaki gibi baskın olarak asidik müsinlerden oluştuğu kanıtlanmıştır (14). Hatta yenidoğan sıçanların bağırsaklarında yapılan bir çalışmada tüm goblet hücrelerinin sülfate müsin ürettikleri gösterilmiştir (15). Hayatın erken evrelerinde bağırsak ortamında asidik müsin varlığının, immün sistemin yeterince fonksiyonel olmadığı yenidoğan bağırsağında, mevcut savunma bariyerine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir (16). Benzer şekilde, yaşa ve intestinal enfeksiyonlarının şiddeti ve sıklığına bağlı olarak da müsin alt tiplerinin yapısal değişiklikler gösterebileceği bildirilmektedir (17).

İntestinal yüzeydeki mukus tabakasının yokluğu veya enzimatik olarak parçalanmasının bakterilerin epitelyal yüzeye ulaşmasına ve hazır karbon ile enerji kaynaklarına erişerek intestinal yapılara zarar verdiğine inanılmaktadır. Müsinin yapısındaki bozulmanın, mikrobiyal proteazlar tarafından başlatıldığı ve nonglikolize “çıplak” bölgelere ilerleyen çok aşamalı bir süreç sonucu geliştiği gösterilmiştir. Öncelikle müsinin jelöz yapısı ve viskozitesi belirgin şekilde azalmakta ve bunu diğer proteolitik ataklara karşı dirençli olan yüksek glikozillenmiş alt müsin ünitelerinin (>500kDa) birikmesi takip etmektedir (18). Bu birikmiş olan müsin glikopeptidleri çeşitli bakteriyel enzimlerle yapısındaki kompleks oligosakkarit zincirlerinin varlığı ve uç kısmındaki sialik veya sülfat grupları, bağlantı tipleri ve boyutlarına göre küçültülür. Örneğin; terminal sülfat ve sialik asit kalıntıları bakteriyel siyalidaz ve glikosülfatazlar

ile parçalanırken, oligosakkarit yan zincirler bağlantıya özgü glikozidazlar tarafından parçalanmaktadır (8).

Belirli mikroorganizmaların belirli glukokonjugatlara bağlanmayı tercih ettikleri bilinmektedir (19). Örneğin, *E.Histolytica* sialidaz enzmine sahip olduğundan dolayı tercihen N-asetilglikozamine bağlanır. *Salmonella typhi* sialik asid içeren bir glikoproteine bağlanmayı tercih eden sialidaz enzmine sahiptir (20). *S.typhi* suşlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada daha ölümcül olan suşların mukus adezyonunda daha üstün olduğu bildirilmektedir (21). Benzer şekilde, *S.typhi*'nin sialomüsine bağlanmasıyla sialidaz ekspresyonunun artmasının da; bu mikroorganizmanın mukusa penetre olmasını kolaylaştırdığı düşünülmektedir (8). *H.pylori* bünyesinde glikosülfataz barındırmakta ve sülfatlı glikokonjugatları bağlamaktadır. Aynı zamanda *H. pylori*'nin müsünün oligomerik yapısını enzimatik yolla bozma yeteneğine sahip olduğu, bu patojenin müsün tabakası içinde son derece etkili flagellası ile serbestçe hareket edebildiği ve müsünün sentezini baskılayabilme özellikleri rapor edilmiştir (20).

Memeli reovirüslerinin müsüne bağlanmasıyla bir mukolitik proteinin ekspresyonunun arttığı, böylece virüsün koruyucu mukus bariyerine penetrasyonunun kolaylaştığı ileri sürülmüştür. Bu örneklerde patojenlerin, mukusun tuzak etkisinin üstesinden gelmek için çeşitli stratejilerle mukolitik üretimini tetikledikleri tahmin edilmektedir (22).

de Repentigny ve ark. (23) *Candida* türlerinin saflaştırılmış ince bağırsak müsünine bağlanmadaki yeteneklerini göstererek *Candida* türlerinin virülansı ile bu yetenekleri arasında korelasyon olduğunu düşünmüşlerdir. *Candida Albicans*'ın intestinal epitele yapışmasının ardından sekretuar aspartil proteinaz üretildiği, bu durumun da müsünün ayrışarak organizmaların mukus tabakasında daha derin bölgelere ilerleyebilmesine izin verdiği bildirilmektedir (8). *V. Cholera* gibi birtakım patojenler, mukus katmana yapışmalarını kolaylaştıracak elemanlara sahiplerdir; örneğin flajelli vibrioların mukus içerisinde yüzdükleri, hareketli olmayan vibrioların ise virülan olmadıkları tarif edilmiştir (24) .

Mukus tabakasından epitelyal hücrelerin bulunduğu yüzey doğrultusunda olan flajeller hareket ilerledikçe; patojenlerin hücre yüzey glikokonjugatları ve glikolipitleri

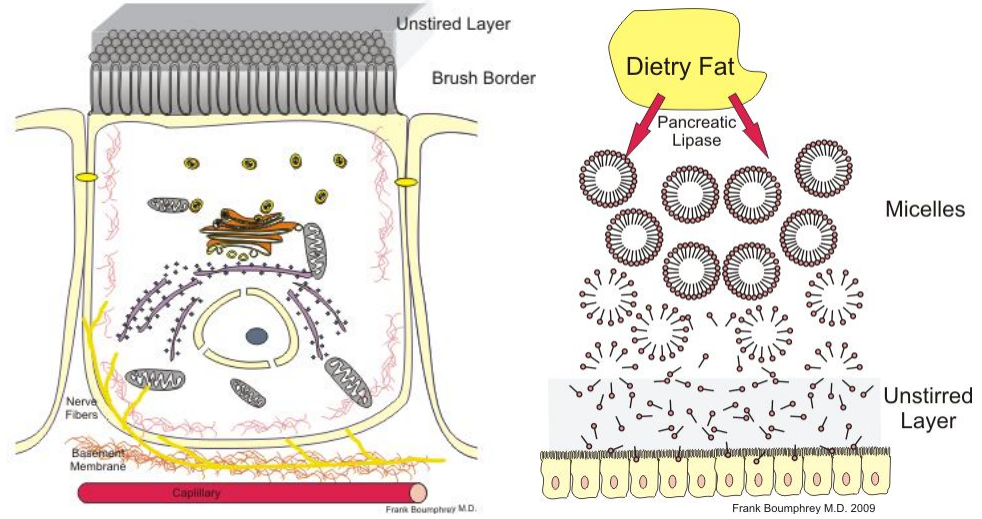
gibi yeni ürünlerle karşılaşma ihtimalleri artacaktır. Beslenme için çeşitli ürünleri kullanabilen hareketli mikroorganizmaların, hareketsiz veya tek tip beslenme özelliğindeki canlılara göre daha avantajlı oldukları tahmin edilmektedir (8).

İnsanlarda yerleşik mukolitik bakterilere göre ile intestinal münlerin spesifik karbohidrat bileşimlerindeki farklılıklar (terminal şekerler, dallanma paternleri vb.) olması, çeşitli genetik farklılıkların varlığının göstergesi olabileceği düşünülmüştür (25).

İntestinal savunma sisteminin immunolojik ve nonimmunolojik bileşenlerinin eksikliğinin de NEK gelişimini kolaylaştırdığı ileri sürülmektedir. Bunların mukus tabakası, mün ve intestinal kommensal yaşayan mikroorganizmalara karşı yaşla birlikte mukus üretiminde görülen değişiklikler olabileceği bildirilmiştir (2). Bağırsak epitelyum hücreleri ve üzerini örten mukus jel tabakası bağırsağın bakterilere karşı ilk anatomik bariyeridir. Mukusun koruyucu fonksiyonları sıklıkla statik olarak kabul edilmiş olmasına karşın, dinamik koruyucu özelliğinin de olduğu ileri sürülmüştür. Bu tez bağırsakları steril olan hayvanlara verilen intestinal mikroorganizmalara karşı mukus sekrete edilmesinin gösterilmesiyle de kanıtlanmıştır (8). Mukusun üretiminin veya bileşiminin özelliklerinde oluşan kusurlar bakterilerin yayılımına izin verip NEK'i kolaylaştığı düşünülmüştür (26).

Bağırsağın asıl fonksiyonel üniteleri olan villuslar gebeliğin 16. haftasından itibaren belirmeye başlar ve kalın bağırsaktaki villuslar 29. haftadan sonra gerilemeye başlar. Villusların yapısında enterosit, Paneth ile Goblet hücreleri ve diğer nöroendokrin ile immün sistemlerle ilişkili hücreler bulunmaktadır (27). Enterositler (epitelyum hücreleri) besin emilimi için özelleşmiş hücreler olup, apikal ve lüminal yüzeyleriyle sindirim işleminin absorpsiyon fonksiyonlarını gerçekleştirirler. Bu absorpsiyon materyallerini interstisyel mesafeye aktarırlar. Epitel hücrelerinin arasındaki sıkı bağlantılar epitelyal bariyerin en önemli komponentidir ve bunların su, iyonlar ve diğer solütlerin geçişlerini kontrol etmek için dinamik olarak görev yaptıkları bilinmektedir (28). Bu epitelyum dokusunun yenidoğanda NEK gelişimini önleyen önemli bir fiziksel bariyer olduğuna inanılmaktadır. Bu doku yapısındaki sıkı bağlantıların (tight junction) kompozisyonunda ve fonksiyonlarındaki yetersizlik epitelyal bariyerde geçirgenliği arttırarak NEK gelişimine katkıda bulunmaktadır (2,28).

Sindirim ürünlerinin enterositlerce absorbe edilmeden önce nüfuz edip geçmesi gereken muköz bir tabaka vardır ki bu tabaka “unstirred” tabaka adıyla tanımlanmaktadır (Şekil 2.1ve 2.2) (29).

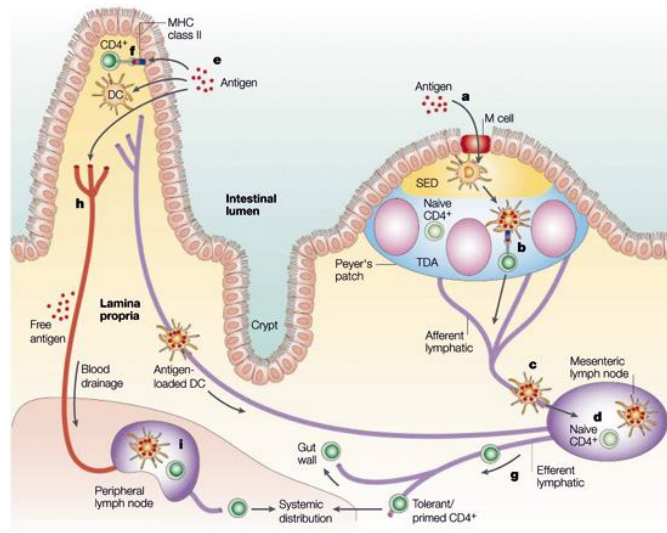


Şekil 2.1ve 2.2. İntestinal yüzeyin korunmasında ve emilimin düzenlenmesinde etkilerin olan “unstirred layer” şematik olarak gösterilmektedir (29).

Epitelyal hücrelerin direkt miçel formasyonu ile hücre içine alarak gerçekleştirdiği yağ emilimi, unstirred tabaka nedeniyle azalır. Ancak, prematür yenidoğanlarda pankreatik ve biliyer fonksiyonlar erişkindeki kadar gelişmediğinden, bu unstirred katmanın lipid emiliminde ciddi bariyer teşkil edebileceği ileri sürülmektedir (30). Suda çözünen moleküllerin unstirred katmandan geçişi büyük ölçüde engellenirken, kısa zincirli yağ asitlerinin epitelyal hücre yüzeyinden kolayca geçtikleri tahmin edilmektedir. Preterm bağırsağında lipidlerin emilimden hemen önceki formunda (bulking phase) kalmaya eğilimli olup absorpsiyonunun gerçekleşmemesi ile uzun zincirli yağ asitlerinin NEK’e yol açabileceği düşünülmektedir (30).

İnce bağırsak epiteli mukozal immun sistemin diğer hücreleriyle sitokinler aracılığıyla etkileşim halindedir. Bu sitokinlerin immun yanıtı ve büyüme faktörlerini düzenleyerek immun hücrelerin proliferasyonunu etkilediği bilinmektedir (31). Ayrıca, ince bağırsak epitelinin T hücrelerine sınıf II major histocompatibility complex (MHC)

mokelülleri veya CD1 molekülleri ile direkt antijen sunduğu kanıtlanmıştır (**Şekil 2.3**) (30). İnce bağırsağın lümeninde mikrovillüs yapısına sahip olmayan ve makromolüküllerin geçişinde görev almayan M hücreleri mevcuttur. M hücreleri, sadece foliküllerle ilişkili epitellerde, mukozal lenfoid dokuda bulunmaktadır (32). Bu hücrelerin, ince ve kalın bağırsak mukozalarındaki lenfoid dokularda yabancı antijenleri ve mikroorganizmaları sunmak için özelleşmiş oldukları bilinmektedir. Böylece lüminal antijenlere spesifik bağışıklıkta önemli rol oynamaktadırlar (27).



Şekil 2.3. İntestinal yüzeyde yer alan M hücreleri, Peyer plakları ve antijene karşı oluşturulan immün yanıt şema ile gösterilmektedir (33).

İntestinal bazal membran, epitel tabakası ve altındaki bağ dokusu arasında yer alan doku olup, biyokimyasal ve immunolojik bariyer görevi yapmaktadır. Bu dokuda kapiller, lenfoid damarlar ve bol lenfosit mevcuttur. Mukus ve seröz salgıları üreten glandlar da bu tabakada yer almaktadır. İntestinal lümeninde bulunan bir antijenin epitelyal membranda oluşturduğu hasar durumunda, immunolojik homeostasi bu tabakadaki lenfoid hücreler tarafından düzenlenmektedir (34).

Mezenkimal hücreler ve bunların yetişkin türevleri olan perisipital ve subepitelyal myofibroblastlar bazal membrandan yaprak (levha) gibi özelleşmiş bir ekstrasellüler matriks tarafından ayrılmıştır. Deneysel hayvan çalışmalarında olduğu gibi insanlarda da, intestinal bazal membranın bağırsak epiteli ve mezenkim hücreleri

tarafından birlikte meydana getirildiği ortaya konulmuştur (35). İntestinal bazal membranın altında plazma hücreleri, İmmunoglobulin A (IgA) sektore eden hücreler, makrofajlar ve diğer lenfositler bulunmaktadır. “Peyer plakları” ismi verilen bu yoğunlaşmış lenf nodu bölgeleri ince bağırsakta en fazla olarak ileumda bulunmaktadır (36).

Mide asidi mikroorganizmalara karşı bariyer görevi görür ve gastrik asit üretiminin azalmasıyla daha yüksek miktarda bakterinin gastrointestinal sistemin distaline kadar ilerleyebileceği düşünülmektedir (37). Düşük doğum ağırlıklı bebeklerde mide asit sekresyonu sınırlı olduğu ve büyük çocuklarda 2-3 olan intragastrik pH'ın, doğumdan sonraki ilk 24-48 saatlerde 5.5-7 seviyelerinde olduğu bildirilmiştir (38). Ayrıca, çeşitli çalışmalarda H2 blokerleri verilen kritik hastalarda nazokomiyal sepsis ve NEK riskinin arttığı gösterilmiştir (39). Bir çalışmada 1500 gram altında olup 24-32 hafta arası 274 yenidoğanda ranitidin verilen ve verilmeyenler kıyaslandığında; ranitidin tedavisi verilen bebeklerde NEK riskinin 6.6 kat arttığı saptanmıştır (40).

Ağızdan beslenebilme, prematür yenidoğan için gelişimsel dönüm noktalarındandır. Bebeğin ağızdan beslenmeye hazır olması; emme-yutma koordinasyonu, gastroözefageal sfinkter tonusu, gastrik boşalma ve intestinal motilite fonksiyonlarının gelişmiş olmasını gerektirir (27). Peristaltizm gelişimle birlikte düzenlenir (41). İnce bağırsak motilitesi 28. gebelik haftasına kadar yeterince gelişmediği, gastro-anal geçiş süresinin uzun olduğu ileri sürülmektedir. Prematür bebeklerde gastroanal geçiş süresi 8-96 saat iken, bu sürenin erişkinlerde 4-12 saat olduğu gösterilmiştir (27). Bunun dışında, var olan motilite hareketlerinin de yetersiz olduğu, 27-30 gebelik haftasında düzensizken; 33-34. haftadan sonra maturitesini tamamladığı saptanmıştır (42). Bu yetersiz motilitenin lümen içindeki toksik maddelerin birikimine yol açarak NEK patogenezinde rol oynadığı ileri sürülmektedir (30). Gebeliğin 32. haftasından daha önce doğmuş olan prematür bebeklerin emme-yutma paternleri term bebeklerden farklıdır. Bu preterm bebeklerin yutma işlemi sırasında emmeyi de koordine etmeleri mümkün olmamaktadır. Dahası, bu bebekler ağızdan beslenmeleri durumunda, gastrik içeriğin trakea ve akciğerlere aspirasyonu ile tehlikeye girmektedirler. Bundan dolayı, çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerde tüple beslenme yöntemi tercih edilmektedir (43).

Besinin direkt olarak mideye ya da ince bağırsağa gönderildiği gastrik veya transpilorik beslenme yönteminde bebeklerin immatür olan emme-yutma koordinasyonları by-pass edilse de; yavaş mide boşalması ve immatür intestinal motilite gibi fonksiyonların hala yetersiz olduğu ileri sürülmektedir (27). Prematür bebeklerde mide boşalması term bebeklerden daha yavaştır ve bu durum daha yüksek hacimde gastrik rezidüye neden olup artmış gastroözefageal reflü riski ile yakından ilişkili bulunmaktadır (44). Gebeliğin 32-39. haftaları arasındaki dönemde bebeklerin kalori ihtiyacı artarken, mide boşalma hızının yetersiz kaldığı, osmolaritesi 279-448 mOsm/kg arasında değişen izokalorik mamaların mide boşalma süresinde anlamlı değişikliğe neden olmadıkları ileri sürülmektedir (45). Gebeliğin son 3 ayı boyunca fetüsün, düşük kalori yoğunluğuna sahip ASndan günde 450 ml hacmine kadar yuttuğu tahmin edilmektedir (27). Prematürlerin erken postnatal dönemde yüksek kalorili formula mamaları, hatta anne sütü ile beslenmeyi bile tolere edemedikleri bildirilmektedir (27).

Erişkinlerde, mide boşalma hızı ince ve kalın bağırsaklardan gelen feedback sinyalleri ile düzenlenmektedir. Bu düzenlenmede duodenal reseptörlerin asit, yağ, karbohidrat ve triptofan ile uyarılmaları rol oynamaktadır (45). Bunların dışında, yükselmiş lümen osmolaritesi de gastrik boşalma hızını azalttığı gösterilmiştir (45). Ancak, çok düşük doğum ağırlıklı, 25-32 gebelik haftaları arasındaki bebeklerin mide boşalma hızlarının kontrolünde bu duodenal feedback'in etkisi yeterince gösterilememiştir (45). Buna karşın, mide boşalma hızını artıran metaklopromid gibi ilaçların kullanımının prematür bebeklerde mide boşalma hızını artırdığı gösterilmiş olmasına rağmen, tardiv diskinezi gibi ekstrapiramidal yan etkilerinden dolayı kullanımı önerilmemektedir (46).

Enteral besinlerin bağırsak kaynaklı enflamatuvar yanıtların önlenmesinde ve düzenlenmesinde etkili olabileceği kabul edilmektedir (47). Bundan yola çıkarak minimal enteral beslenmenin bağırsak mukozasının yapısal bütünlüğünün korunması ve postnatal dönemde de GİS gelişiminin devamında gerekli olduğu gösterilmiştir (48). Ancak, enteral beslenmenin riskli olduğu durumlarda total perenteral beslenme (TPN) kullanılmaktadır. TPN bir beslenme yöntemi olup, yenidoğan ve özellikle prematür bebeklerde sıklıkla kullanılmaktadır. Birçok faydası olmasına karşın içeriği, verilme hızı, verilme yolu ile ilişkili komplikasyonları bildirilmektedir. Enteral beslenmeyle

karşılaştırıldığında TPN, villus yükseklik ve genişliğini, mukozal kütle ve DNA içeriğini azaltarak ve azalmış disakkaridaz aktivitesi ile gastrointestinal sistemin yapısında değişikliklere neden olduğu deneysel çalışmalarda ortaya konulmuştur (48). Bu beslenme şeklinin lamina propria enflamatuar hücrelerin yerleşimi ve bakteriyel translokasyonu kolaylaştırdığı da bildirilmiştir (Şekil 2.4) (8).



Şekil 2.4 TPN ile ilişkili problemler (27)

Yenidoğanda mukozal yüzeyler ve intestinal lümeninde endojen bakteri kolonizasyonu çeşitli aşamalarda meydana gelmektedir. Birinci aşama doğumdan itibaren ilk iki haftadır (49). Bu dönemde gram pozitif, spor oluşturmeyen anaeroblar yerleşir. Anne sütü ile beslenenlerde *Bifidobacteri* türleri, formül mama ile beslenenlerde ise *Lactobacillus* türleri hakimdir. Bakteri kolonizasyonunun ikinci fazı katı gıdaların tüketiminin başlanmasına kadar devam eder. Bu aşama boyunca *Bacteroides* türleri progresif olarak artarak erişkinlerdekine benzer bir flora meydana getirmektedirler. Özellikle anaerob bakteriler olmak üzere, endojen intestinal flora, intestinal epiteli örterek patojenik bakterilerin buraya yapışmasını engelleyerek koruyucu rol oynamaktadır. Bakteriyel kolonizasyonun birinci fazında anaerobların göreceli olarak daha az olmasından dolayı, bu dönemde yenidoğan gastrointestinal sisteminde patojenik bakterilerin daha kolay kolonize olarak ilk 2 haftada daha sık NEK gelişmesine katkıda bulunduğu inanılmaktadır (49). *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* gibi spesifik anaerob bakterilerin vitamin sentezinden başka, laktik asit, asetik asit, formik asit gibi fermentasyon ürünlerini, antimikrobiyal bakteriosinler ve yağ asitlerini

ürettikleri için bakteriyel translokasyona karşı koruyucu rol oynadıkları ileri sürülmektedir (50). Salgısal IgA'nın da bakteriyel translokasyona karşı koruyucu özelliği bilinmektedir (36).

Korunmada, makrofajların bakterileri fagosite etmelerinin önemli olduğu ve fagositlerde öldürülemeyen enterovirulan bakterilerin mezenterik lenf nodlarına ulaşarak burada serbest kaldıkları gösterilmiştir (36). Bu durumun özellikle düşük doğum ağırlıklı bebeklerde daha sık görüldüğü ileri sürülmektedir (51). Bağırsak veya safra yollarında obstruksiyon, immunsupresyon, hemorajik şok, çoklu travma, yanık gibi bariyer yetersizliğine neden olan birçok durumda translokasyon ve sistemik enfeksiyonların gelişerek NEK'in gelişimini kolaylaştırdığı bilinmektedir (52).

Yenidoğan izleminde kullanılan bir takım uygulamalar (beslenme sondalarının mide duvarına dayanması veya daha distale ilerletilmesi ve geniş spektrumlu antibiyotiklerin rutin kullanılması) da kolonizasyon ve translokasyonu kolaylaştırmaktadır. Ayrıca, bebek gastrointestinal sisteminin immatür olmasının ve yetersiz enteral beslenmenin de kolonizasyonu kolaylaştırdığı bildirilmektedir (27). Preterm doğan bebekler, özellikle de sezaryen yöntemi ile doğanlarda term bebeklere göre intestinal bakteriler daha az çeşitlilik gösterdiği ve bu durumda patojenik olan *E.Coli*, *Clostridium*, *Klebsiella* ve *Bacteroides* türlerinin yerleşmesine zemin hazırladığı tahmin edilmektedir. Bu patojenik türlerin aşırı çoğalması immatür bağırsakta uygunsuz enflamatuvar süreçleri tetikleyerek nekroza ve bakteriyel translokasyon ile de sepsise yol açabilmektedir (53). Bakterilere yanıt olarak üretilen sitokinler de epitelyal geçirgenliği artırarak bakteri translokasyonunu kolaylaştırabilmektedir (53).

NEK gelişen vakaların intestinal doku örneklerinde proenflamatuvar sitokin seviyelerinin artmış olması NEK'in gelişiminde bu mediatörlerin rol oynadığını da düşündürmektedir (54). Atomlarda elektronların "orbital" adı verilen uzaysal bölgede çift olarak buldukları, moleküllerin çoğunun çift elektronlu, az sayıda molekülün ise tek yani eksik elektronlu olduğu bilinmektedir (55). Eksik elektronlu bu moleküller bulabilecekleri herhangi bir elektron ile iletişime girerek, bu molekülden bir elektron almakta, ya da ona bir elektron vermekteler (55). Fizyolojik veya patolojik reaksiyonlar esnasında başka moleküller ile kolayca elektron alışverişine girip onların yapısını bozan bu moleküllere "serbest radikaller", "oksidan moleküller" veya en doğru

adlandırma ile “reaktif oksijen partikülleri” denmektedir (55). Bunların en önemlilerinin süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri oldukları bildirilmektedir (55). Serbest oksijen radikalleri (SOR); aktive olmuş fagositler, antineoplastik ajanlar, radyasyon, alışkanlık yapan maddeler, çevresel ajanlar, stres, küçük moleküllerin otooksidasyonu, enzimler ve proteinler, mitokondrial elektron transport sistemleri, peroksizomlar, plazma membranı ve oksidatif stres yapıcı durumlardan kaynaklanmaktadır (55). Bunlardan başka, enflamatuvar hastalıklarda, lokal enflamasyonda, normal yara iyileşmesinde, iskemik ve reperfüzyonda, iyonizan radyasyon ve herbisit etkileriyle toksik miktarda serbest radikaller oluşmaktadır (55). Postiskemik dokuda da oluşan serbest oksijen radikallerine yol açan iki kaynak olup bunlardan birincisi; hipoksantin ve moleküler oksijen ile ksantin oksidaz enziminin reaksiyon zincir, ikincisi ise iskemik doku içine nötrofillerin infiltrasyonu olarak ileri sürülmektedir (56). SOR'nin önemli bir kaynağı ksantin oksidaz enzimi olup, post-iskemik durumda polimorfonükleer lökositlerin içerdikleri myeloperoksidaz enzimi ile iskemik hasarda rolü olan serbest oksijen radikalleri meydana gelmektedir. Grisham ve ark. (56) kedi bağırsağında iskemik-reperfüzyonun polimorfonükleer hücrelerin birikimi ile mukozal myeloperoksidaz seviyelerinde 18 kat artışı göstermişlerdir.

İnflamasyon sırasında endotelial hücreler, lökositler, trombositler, makrofajlar ve mast hücrelerinden salınarak artan bu reaktif oksijen ürünleri endotelial bariyer yetersizliğinin potansiyel mediatörü olarak öne sürülmektedir. Reaktif oksijen ürünlerinin bu etkiyi çeşitli yollarla gösterebildikleri; direkt etki “katenin”lerin fosforilasyonu ile vasküler endotelial “kadherin”lerin ayrışması, aktin-miyozin sitoskeletal kontraksiyonu ve endokapiller glikokaliks tabakasında parçalanma ile oluşabileceği bildirilmektedir (57). Reaktif oksijen ürünlerinin indirekt etki mekanizması ise, oksidan hassasiyete bağlı olarak lökositlerin artan adezyonu, transendotelial migrasyonu, epitelyal hücrelerin adezyon moleküllerinin transkripsiyonlarında artış ve “matriks metalloproteinazları” (MMP) gibi latent proteazların aktivasyonu yolları ile meydana geldiği düşünülmektedir (57). İnflamasyon aracılı gelişen bariyer fonksiyon değişikliklerinde de lipid peroksidasyonu yolu ile membran hasarı yapabilen yükselmiş reaktif oksijen ürünleri suçlanmaktadır (58).

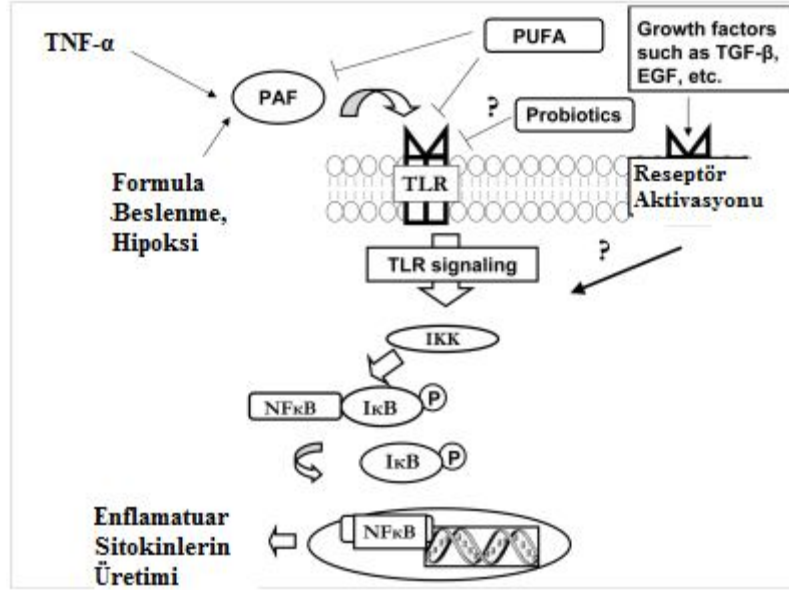
Antioksidan moleküller endojen veya eksojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirilmektedirler. Hücre dışı savunma sistemi, albümin, bilirubin, transferin, seruloplazmin, ürik asit gibi çeşitli molekülleri içermektedir. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır. Bu enzimler süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon S-transferaz, glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz, katalaz (CAT) ve sitokrom oksidaz olarak bilinmektedir. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gerekmektedir (59). Serbest oksijen radikallerinin NEK patogenezindeki rolü tanımlanmıştır (60). Serbest oksijen radikalleri hücrel ve mitokondriyal membranların içindeki lipid peroksidasyonu yoluyla dokulara zarar vermekte, oksijen radikallerinin yüksek seviyede olması ve immatür savunma sisteminin birlikteliği yenidoğanda oksidan aracılı hasar riskini artırmaktadır (61). İntestinal hücre hasarı sırasında mekanizma nasıl olursa olsun, reaktif oksijen ürünlerinin önemli hücrel sinyalleri aktive ettiği ileri sürülmektedir. Hipoksi ve reoksijenasyon hasarından sorumlu tutulan bu moleküllerin apoptosisi de tetikleyebileceği tahmin edilmektedir (62).

Endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) olarak da bilinen nitrik oksit in eşleşmemiş bir elektron taşıyan yüksüz bir molekül olduğu bilinmektedir (63). NO'nun bu özelliğinden dolayı onun eşsiz bir mesajcı olduğu düşünülmektedir. Yani yüksüz olduğu için membranlardan kolayca geçerek hızlıca reaksiyona girmektedir. Yarı ömrü 20-30 sn olan NO, vasodilatatör etkinin yanı sıra, vasküler zararlanma, enflamasyon ve trombosise karşı koruyucu etkileri olduğu tahmin edilmektedir. NO lökositlerin endotele adesyonunu inhibe edip, vasküler düz kas hücrelerinin nonproliferatif konumda kalmasını sağlayarak platelet agregasyonunu sınırlamaktadır (63). Nitrik oksit in çok sayıda fizyolojik ve patolojik süreçte önemli rol oynadığı da bilinmektedir (63). Yakın zamanda yapılmış bir çalışmada NEK'in ciddiyeti ile toplam oksidan seviye ve oksidatif stres indeksi arasında ilişki ortaya konmuştur (63). Perrone ve ark. (64) preterm doğan, NEK gelişen bebeklerin kordon kanlarında oksidatif stres parametrelerinin daha yüksek olduğunu tespit edip, kordon kanında oksidatif stres mediatörlerinin ölçümü ile NEK için yüksek riskli bebeklerin önceden tahmin edilebileceğini ileri sürmüşlerdir.

İnflamatuvar sitokinlerin, NO sentaz up-regulasyonu ile NO'in lokal üretimini artırdıkları ve sonunda artan peroksinitrit gibi ara reaktif azot ürünlerinin bariyer disfonksiyonunu artırabileceği ileri sürülmüştür (65). Bu karmaşık enflamasyon sürecinde bağırsakta güçlü vazokonstriksiyon veya aşırı vazodilatasyonu uyaran vazoaktif maddelerin salındığı da gösterilmiştir. Bu vazoaktif maddelerden platelet aktive edici faktör (PAF), Endotelin-1 ve nitrit-peroksinitritin NEK ile ilişkileri ortaya konulmuştur (66). Ayrıca intestinal duvarda meydana gelen enflamasyon sonrası kompleman ve koagulasyon sistemlerinin de tetiklendiği de bilinmektedir (67). Uyarılmış lökosit ve trombositlerin endotele yapışarak ince bağırsağın mikrovasküler kan dolaşımını tıkadıkları düşünülmektedir (66). Ayrıca, salınan nitrik oksidin üretiminin bozulmasına bağlı vazospazm ile de perfüzyonu da etkiledikleri ileri sürülmektedir (66). Önceki çalışmalarda, intestinal mukozal hasarın arka planında SOR, PAF, lökotrienler ve TNF- α gibi inflamatuvar mediatörlerin bulunduğu bildirilmiştir. Dokuda stres yaratan nedenin ardından PAF salınımı tetiklenmekte, ardından sırasıyla inflamatuvar sitokinler salınmakta ve aktive polimorfonükleer lökositlerin migrasyonu gerçekleşmekte; sonuçta da SOR ürünlerinin fazlaca üretimi ile doku hasarı gelişmektedir. Bu reaktif oksijen ürünlerinin antioksidan sistemler tarafından sınırlandırılmadığı durumlarda çeşitli mekanizmalarla, özellikle hücrel membran lipidlerinin peroksidasyonu ile hücre hasarı ve takiben hücre nekrozu ve ölümü meydana gelebilmektedir (62).

Aktive olan koagulasyon sisteminin oluşturduğu trombüs, fibrin molekülleri, fibronektin, vitronektin ve trombospondinleri içermektedir (68). Bu moleküller de lökositlerin, fibroblastların ve endotelial hücrelerin migrasyonunu sağlamaktadır. Dokuda yoğunlaşan trombositler de kemotaktik faktörleri ile lökositlerin infiltrasyonunu uyarmaktadır. Hem lökositlerde hem de trombositlerden sitokinler ve büyüme faktörleri salınarak süreç düzenlenmektedir (68). IL-1 α , IL-1, IL-6 ve TNF- α enflamasyonda, FGF-2, IGF-1 ve TGF- β kollajen sentezinde, FGF-2, VEGF-A, HIF-1 α ve TGF- β angiogenesisde, EGF, FGF-2, IGF-1 ve TGF- α reepitelizasyon için gerekli oldukları bilinmektedir (68). Nötrofiller tarafından üretilen TNF- α , IL-1 ve IL-6 gibi mediatörler inflamatuvar yanıtı artırmakta ve bu mediatörler de doku tamirinde gerekli olan VEGF ve IL-8 üretimini stimule etmektedirler (69). Enflame dokudan katyonik peptidler ve "eikosanoid"ler gibi yüksek antimikrobiyal etkili maddeler, elastaz,

katepsin G gibi proteinazlar da salınmaktadır (69). Bunların salınımı da NEK patogenezinin katkısında bulunmaktadır.



Şekil 2.5 TLR Aktivasyonu ve enflamatuar yanıtın düzenlenmesi (70).

Toll like reseptörler (TLR) lenfosit ve fagositler dahil olmak üzere immün sistemle ilişkili birçok hücrede bulunan transmembran proteinlerdir (71). Bu transmembran proteinler intestinal epitelyum hücrelerinde ve bunların endozomlarında da bulunmaktadır. Bilinen 10 tip TLR mevcut olup TLR 1-2-3-4-5-9 tipleri insan ince bağırsağında tespit edilmiştir (71). TLR 2,4,5 ve 9; bakterilerin ve mantarların lipopolisakkarit (TLR4) gibi ortak yapısal elemanlarını, TLR5 flagellini, TLR3 ise özellikle çift sarmallı viral DNA'yı tespit etmektedir (72). TLR aktivasyonu, enflamatuar ve immün yanıtın düzenlenmesinde TNF- α ve IL-1 β 'dan başka nükleer faktör kappa (NF- κ) proteininin de transkripsiyonunu artırarak rol oynamaktadır. NF- κ , tekrar dinlenme safhasında sitoplazmada bulunan inhibitör κ B (I κ B) proteinlerine bağlanmaktadır (73). *In vivo* ve *in vitro* çalışmalarda immatür enterositlerde I κ B ekspresyonunun azalmasına bağlı olarak NF- κ B aktivitesinin arttığı da gösterilmiştir (74). TLR'lere kuvvetlice bağlanan adaptör proteinler TLR'lerin C-terminal bölgesi ile kompleks oluşturmaktadır (75). Oluşan bu kompleks, mitojen aktive edici protein kinazı aktive edip, NF- κ B ve diğer enflamatuar sitokinler ve kemokinlerin nükleer translokasyonlarını uyararak üretimini artırmaktadır (Şekil 2.5) (75). TLR aktivasyonu; intestinal epitelyum hücrelerinin çoğalması, hücreler arası sıkı bağlantıların

sürdürülmesi, IgA üretimi, AMP ekspresyonu ve zarar görmüş intestinal epitelin iyileşmesi gibi birçok süreçte anahtar rol oynamaktadır (76). Ayrıca aktivasyonu ile enterosit apoptosisinde artışa ve bariyer geçirgenliğinde azalmaya da neden olduğu gösterilmiştir (77). TLR4'ün endotoksin veya lipopolisakkaritlerle aktivasyonu ile miyeloid diferansiyasyon sinyali ile TNF- α , IL-1 β , IL-6 gibi pro-enflamatuar genler de indüklenmektedir (77).

İnterlökin-1 (IL-1) makrofajlar ve diğer antijen sunan hücrelerden salınan bir sitokin olup iki ayrı komponenti mevcuttur; IL-1 α , hücreyle ilişkili protein ve IL-1 β , sekretuar molekül (78). IL-1, TNF- α ile stimüle edilip ve enflamatuar yanıt desteklemektedir. Sık yükselen ateş, endotele lokosit adezyonunun ve fagositoz aktivasyonunun artırarak bu etkisini ortaya koymaktadır (78). Ayrıca, IL-1 β 'nin enflamasyon bölgesinde nötrofil sayısını artıran IL-8 genini de aktive ettiği gösterilmiştir (79). Bu özellikleri nedeniyle IL-1'in, sepsis ve multiorgan yetersizliği ile karakterize olan sistemik enflamatuar yanıt sendromunda (SIRS) önemli bir rol oynadığı da düşünülmektedir (80). Enflamatuar bağırsak hastalığı olan hastaların ve NEK'li yenidoğanların intestinal örneklerinde yapılan çalışmalarda IL-1 β 'nin dokularda yükselen seviyesi gösterilmiştir (81, 82). Enflamatuar bağırsak hastalıklarında, intestinal dokudan başka dolaşımda da IL-1 β 'nin arttığı bildirilmiştir (83). Tavşanlarda immün kompleks koliti oluşturulan deneysel bir çalışmada IL-1 α ve IL-1 β seviyelerinin intestinal enflamasyon, ödem ve nekroz gelişimiyle korele olduğu da ileri sürülmüştür (84). Diğer pro-enflamatuar sitokinlerle birlikte salınan interlökin-6 (IL-6), aktive lenfositlere etki ederek B hücrelerinde antikor üretimi ve sitotoksik T hücrelerinin farklılaşması sağlanmaktadır (85). IL-6 endotel, makrofajlar ve yardımcı T hücrelerinde üretilmekte olup, C-Reaktif Protein (CRP) ile birlikte akut faz reaktanlarının major proteinlerinden biri olduğu bilinmektedir (86). Sepsis veya sistemik enflamatuar yanıt sırasında bakteriler, endotoksinler ve diğer sitokinlerin etkileriyle enterositlerden de salınan IL-6'nın artmış olduğu ileri sürülmüştür (85). Fetal kanda yükselen IL-6 seviyesinin yükselmiş neonatal morbidite ile anlamlı ilişkisi ortaya konmuştur (87). Yenidoğanların plazma IL-6 seviyelerinin incelendiği bir çalışmada ise bakteriyel sepsis ve üzerine NEK gelişen bebeklerde sadece sepsisi olan grup veya kontrol grubuna göre IL-6 seviyelerinde 5-10 kat artış bildirilmiştir. Aynı çalışmada kurtulan ve kaybedilen

hastalar değerlendirildiğinde; IL-6'nın artmış mortalite ile de ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (88).

Enflamatuar sitokinlerden olan İnterlökin-8 (IL-8) monositler, makrofajlar, T hücreleri ve endotelden salınmaktadır. Dolaşımdaki nötrofillerin integrinlerini aktive etmekte, böylece onların vasküler endotelyuma adezyonlarını sağlamaktadır. Nötrofil, eosinofil ve T hücreleri için kemotaksis, CD11b/CD18 gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonunun indüklenmesi ve bazofillerden histamin salınımının inhibisyonunda etkili olduğu da ileri sürülmektedir (89). Migrasyonu sağlamasından başka, nötrofilleri direkt aktive ederek nötrofil adezyon moleküllerinin ekspresyonunu düzenlemektedir (86). Gastrointestinal sistemde de enflamasyon sırasında IL-8'in potansiyel kemotaktik faktör olabileceği tahmin edilmektedir. Buna ek olarak, endotelin albumine vasküler geçirgenliğini artırıp doku ödemeine yol açabileceği ileri sürülmüştür (30). Mukozal enflamasyonda intestinal lamina propria hücrelerinden üretilen IL-8'in enflamatuar bağırsak hastalıklarında merkezi rolü olabileceği düşünülmektedir (90).

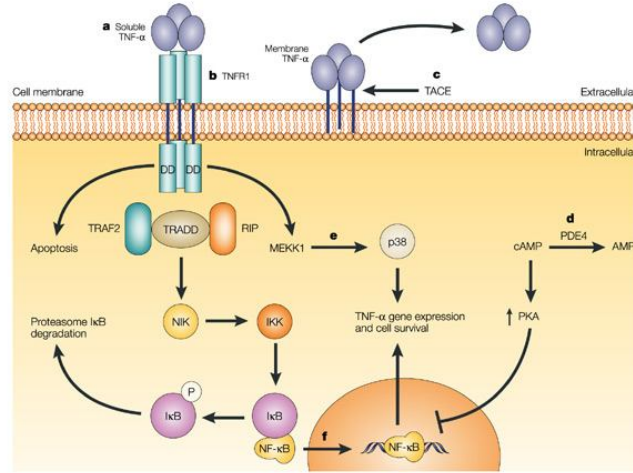
Sitokinlere ek olarak NEK gelişiminde PAF'ın da rol oynadığı tahmin edilmektedir. PAF, enflamatuar hücreler, endotelial hücreler, trombositler ve intestinal bakteriler tarafından üretilen fosfolipid yapıda bir molekül olup, trombositler ve nötrofiller üzerinde bulunan PAF reseptörleri (PAFr) üzerinden etki etmektedir (91). "PAFr" aktivasyonu ile hızlıca trombositler agregasyon göstermektedir. Buna ek olarak PAF'ın sistemik etkisi ile hipotansiyon ve sistemik şok bulguları ortaya çıktığı bildirilmektedir (7). Deneysel bir sıçan çalışmasında PAFr antagonisti ile endotoksin ve hipoksiye bağlı gelişen intestinal hasarın azaltılabileceği ileri sürülmektedir (92). Başka bir çalışmada ise IL-1 α gibi sitokinlerin PAF tarafından uyarılan trombositlerden salındığı tahmin edilmektedir. Buna göre, fibrin pıhtılarının içinde yüksek miktarda bulunan bu sitokinlerin sitokin aktivitesi için rezervuar olabileceği düşünülmektedir (93). Farklı dokuların PAFr konsantrasyonları polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile incelenmiştir. Buna göre; kalp, akciğer, böbrekler gibi diğer organlarda %1'in altında iken, ileumdaki PAFr konsantrasyonunun %56 olduğu bildirilmiştir (94). İleumda yüksek konsantrasyonda tespit edilen bu PAFr seviyesinin, ince bağırsak nekrozu ile ilerleyen NEK'te sorumlu olabileceği tahmin edilmektedir (94). PAF'ün yıkımı PAF-asetil hidrolaz enzimi ile gerçekleşmektedir (95). NEK patogeneğinde etkili

olabileceği düşünölen bu enzimin seviyesinin NEK gelişen bebeklerde düşük olduğu da bildirilmektedir (95). Ayrıca PAF-asetil hidrolazın anne sütü ile beslenenlere göre formula mama ile beslenen bebeklerde daha düşük olduğu da ileri sürölmüştür (96).

Akut faz reaksiyonunu stimüle eden sitokinlerden olan TNF- α 'nın sistemik enflamasyonda yükseldiği bilinmektedir (97). TNF aktive olmuş makrofajlar, CD4+ lenfositler ve Natural Killer (NK) hücrelerin tarafından üretilmektedir. TNF- α 'nın primer görevi immün yanıtın düzenlenmesidir. Endojen pirojenlerden olup vücut ısısını artırmakta, apoptotik hücre ölümünü tetiklemekte, sepsis kliniğinde IL-1 ve IL-6 gibi sitokinlerin salınımını sağlamaktadır. Bunlardan başka tümörigenez ve viral replikasyonu inhibe ettiği de bilinmektedir (97). TNF- α 'nın IL-6 ile birlikte hipotalamo-hipofizer aks üzerinden; kortikotropin releasing hormon (CRH) salınımını uyardığı, iştahı azalttığı, vücut ısısını yükselttiği, karaciğer üzerinden; CRP ve diğer mediatörlerle akut faz yanıtını düzenlediği, ayrıca insölin direncini artırdığı ortaya konmuştur (97). TNF- α üretimi ve fonksiyonunun düzensizliğinde Alzheimer hastalığı, kanser, major depresyon ve enflamatuar bağırsak hastalıklarına neden olabileceği de gösterilmiştir (98-101). Nötrofiller için potent kemoatraktan olan TNF- α , endotel hücrelerinde adezyon moleküllerinin ekspresyonunu da artırmakta, böylece nötrofil migrasyonuna yardımcı olmaktadır. TNF- α 'nın lokal konsantrasyonunun artmasının da dokuda enflamasyonun ısı, kızarıklık, ağrı, şişlik ve fonksiyon kaybı gibi temel bulgularına yol açtığı bilinmektedir (97).

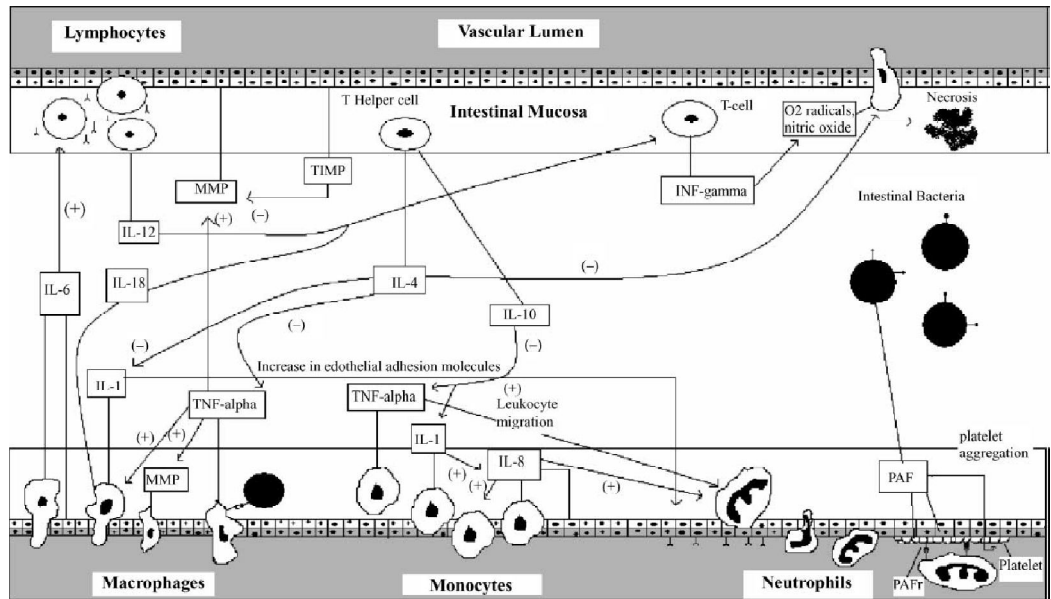
TNF, iki ayrı reseptöre bağlanabilmektedir; TNF-R1 ve TNF-R2. TNF-R1 birçok dokuda espres edilip, membrana bağlanan ve çözünmüş olan trimerik formlarla aktive olmaktadır. TNF-R2 ise, sadece immün sisteme ait hücrelerde bulunmakta ve membrana bağlanan TNF trimerleri ile aktive olmaktadır (**Şekil 2.6**) (102). TNF molekülleri ligandları ile temas ettiği zaman TNF reseptörlerinde konformasyonel değişiklik meydana gelmekte, intrasellöler ölüm sinyalinii sağlayan Silencer of Death Domains (SODD) inhibitör proteininin ayrışmasına yol açmaktadır. Bu ayrışmanın ardından, ölüme götüren adaptör protein olan Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1 Associated Death Domain Protein (TRADD) proteini aktive olmaktadır (**Şekil 2.7**) (103). TRADD aktivasyonu ile 3 ayrı yol tetiklenmektedir. NF- κ B yolu ile enflamatuar sitokinlerin üretimi ve salınması, nükleusa etki ederek hücre çoğalmasını uyarmaktadır.

Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) yolu üzerinden hücre farklılaşması, çoğalması ve pro-apoptotik değişikliklerin düzenlenmesi sağlanmaktadır. Bunlardan başka, TNF-R1 reseptörü üzerinden hücre ölümü sinyali ile apoptosise gidişi düzenlenmektedir (104).

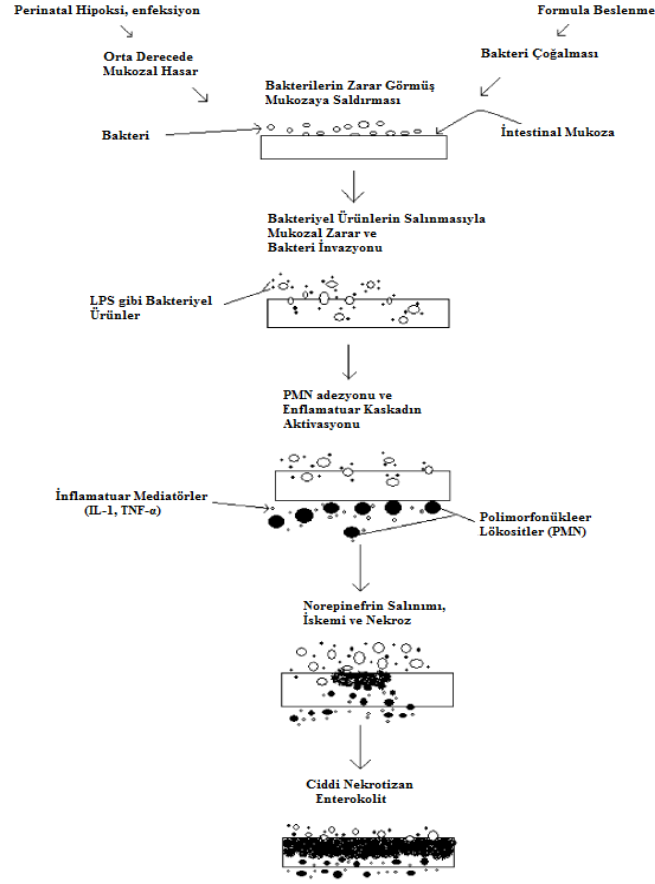


Nature Reviews | Drug Discovery

Şekil 2.6 (a ve b) TNF- α ve transmembran protein yapısındaki TNF-R1 reseptörü (c) TNF- α 'nın bağlandığı diğer yüzey proteini olan TACE (TNF- α converting enzyme), molekülün dolaşım içinde serbestçe bırakılmasını engellemektedir. (d ve e) TNF- α 'nın intrasellüler sinyal yolları (f) NF- κ B aktivasyonunun engellenmesi (105)



Şekil 2.7 Enflamatuar kaskad toksik metabolitlerin üretimi ile intestinal mukozaya zarar veren çok sayıda proenflamatuar ve düzenleyici sitokinlerin salınımı. (106).



Şekil 2.8 Nekrotizan enterokolitte hipoksi, formula ile beslenme ve bakteri çoğalması ile aktive olan enflamatuvar kaskad; doku iskemisi ve nekrozu (106).

Pro-enflamatuvar sitokinler intestinal sistemdeki bariyerlerin koruyuculuğunu azaltmasına karşın, interlökin-10 gibi anti-enflamatuvar sitokinlerin enflamatuvar cevabı yumuşatarak koruyucu rol oynadıkları ileri sürülmektedir (107). IL-10'un gastrointestinal sistemde önemli bir immünoregulator olabileceği ve intestinal enflamasyonun derecesini azaltarak NEK'in patogeneğinde etkili olabileceği düşünülmüştür (107). Bu interlökin; 32kDa ağırlığında olup T hücreleri, timosit, monosit, makrofaj ve Langerhans hücrelerinden salınmaktadır. Salındıktan sonra; IL-1, IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF sentezlerini inhibe etmektedir. Bunlarda birlikte, T hücreleri ve makrofajları da baskılamaktadır (107). Ayrıca, birçok enflamasyon sırasında IFN-gama ile birlikte salınarak doku hasarının azaltılmasına katkıda bulunmaktadır (89). Deneysel intestinal iskemisi sıçan modelinde intraperitoneal IL-10 enjeksiyonu ile lokal ve sistemik enflamatuvar reaksiyonların azaldığı ileri sürülmüştür (108). IL-10'un ayrıca, kültüre hücrelerde metalloproteinazları da azalttığı

gösterilmiştir. Bu yolla doku hasarının da azaltılabileceği tahmin edilmektedir (109). Enflamasyon sürecinde güçlü bir karşı düzenleyici sitokin olan IL-10'un NEK tedavisinde ileride potansiyel seçeneklerden olabileceği düşünülmektedir (106).

Endotelin-1 ilk olarak endotelde tespit edilen en güçlü vazokonstruktör bir molekül olarak tanımlanmaktadır (110). Preproendotelin olarak bilinen 203 aminoasitli daha uzun bir öncül molekülden proteoliz ile 21 aminoasitli Endotelin-1 meydana gelmektedir. Yükselmiş Endotelin-1 seviyelerinin çeşitli kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon, konjestif kalp yetersizliği, kronik böbrek yetersizliği gibi çok sayıda hastalıkla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Birden fazla sistemin etkilendiği preklampsi etyopatogenezinde de Endotelin-1 ile oluşan vazokonstrüksiyon suçlanmaktadır (111).

Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) angiogenezi uyaran bir sinyal proteini olup, doku oksijeninin yetersiz kaldığında kan dolaşımını geri döndürmeye çalışan sistemin bir elemanı olarak tanımlanmıştır. Embriyonik gelişim aşamalarında, cerrahi veya yaralanma sonrası yeni damar oluşumunda, egzersiz sonrası kas dokusunda ve tıkanan damarların yerine kollateral dolaşımın sağlanmasında etkileri gösterilmiştir (112). Anjiyojenik bir faktör olan VEGF'nin ülseratif kolitin fizyopatolojisinde etkili olabileceği düşünülmüştür (113). Weil ve ark. (114) mezokimal kök hücrelerinin, hipoksi ile hasara uğratılmış fetal intestinal epitelyum dokusunun canlılığını kazanmasında ve çoğalmasında etkili olabileceğini öne sürmüşlerdir. Çalışmalarında mezokimal kök hücrelerden parakrin yolla salınan IL-6, Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF) ve VEGF etkisi ile apoptotik sinyalin baskılanarak canlılığın ve hücre proliferasyonunu sağlandığını bildirmişlerdir.

NEK etyopatogenezinde ileri sürülen faktörlerin biri de intestinal perfüzyonun bozulmasıdır. Normalde gastrointestinal sistemin kanlanması truncus coeliacus, superior mesenterik arter ve inferior mesenterik arter yollarıyla sağlanmaktadır (115). Venöz drenajı ise direkt olarak kalbe iletilmek yerine, emilen maddelerin gerekirse detoksifiye edilmeleri için portal ven yoluyla öncelikle karaciğere iletilmektedir. Gastrointestinal kan akımı dinamik bir düzenlenmeye sahip olup, farklı durumlarda perfüze edilen organların kütlesi ile buraya iletilen kardiyak "output"un orantısız olabileceği ileri sürülmektedir. Buna göre; açlıkta kardiyak outputun %5'i gastrointestinal sisteme iletilirken, beslenme sırasında bu oran %25'e çıkabilmektedir (116). İntestinal

perfüzyonun bozulmasına yol açan açık patent ductus arteriosus (PDA) varlığında NEK insidansının arttığı bilinmektedir (117,118). Umbilikal kateter yerleştirilmiş olan hastaların NEK gelişimi için riskli olduğu bilinmektedir. Göbek kateterizasyonu uygulanmış hayvan modelinde Doppler ultrasonografi yöntemi ile yapılan incelemede mezenterik arter akımının ciddi derecede düştüğü gösterilmiştir (119). Konjenital kalp hastalığı olan yenidoğanlarda yapılan bir çalışmada tedavideki gelişmelere rağmen, operasyona giden hastaların %60'ında NEK saptanmıştır (120). Başka bir çalışmada da konjenital kalp hastalığı olan 935 yenidoğanın 70'inde evre 3 ve 4 NEK geliştiği, düşük doğum ağırlığı ile birlikte konjenital kalp hastalıklarının varlığının mortalite riskini artırdığı bildirilmektedir (121). Stress varlığında sistemik kan akımından mesenterik alana yönlendirilen kan miktarı sempatik sinir sisteminin güçlü aktivasyonu ve nörepinefrinin salınması ile azalmaktadır (122). Normal şartlarda preterm bebeklerde yaygın olmayan hipoperfüzyon ve iskemi-hipoksemi durumları direkt ve/veya enflamatuvar mediatörlerle mukozal hasara yol açmaktadır (123).

NEK'in patogenezinde hayatı tehdit eden esas unsurun intestinal submukozadaki trombüs olduğu ve bu olayın intestinal villüste koagulasyon nekrozuna yol açtığı bildirilmiştir (66). NEK etyolojisi gözetilmeksizin yapılan bir incelemede 84 vakanın patolojik olarak değerlendirilmesinde esas görülen lezyonun koagulasyon nekrozu olduğu gösterilmiştir (124). İntestinal villusun apeksinden itibaren başlayan bakteriyel invazyonu submukozadaki arteriolar pleksusda tromboz takip etmektedir (66). Bu yolla koagulasyon sistemi hızlıca aktive olmakta ve bağırsak duvarından mezenterik bölgeye doğru uzanan büyük kan damarlarında trombüs ilerlemektedir. Bu mekanizma ile lamina propriadaki enflamasyonun yoğunluğuna bağlı olarak segmental nekroz bölgelerinin oluşması açıklanmaktadır (125).

Term bebeklerde doğumdan itibaren "Fetal Hemoglobin" (HbF) azalarak yaklaşık postnatal 25. haftada yerini Hemoglobin A (HbA)'ya bırakmaktadır. Bununla birlikte HbA'nın yükselmesi iki aşamalı olduğu ileri sürülmektedir. Doğumdan sonraki 6 hafta içinde hemoglobin üretimi yavaş olup, bundan dolayı doğumdan sonraki ilk 6 hafta hemoglobin miktarında azalma olduğu bildirilmiştir (126). Term bebeklerde 6 hafta olan bu geçiş süresi pretermelerde daha yavaş ve uzun süreli olup oksijen taşıma kapasitesi ve dokuların oksijenlenmesini etkilemektedir (126). Oksijenin dokuda

bulunmasının, yara iyileşmesi, hücre çoğalması, bakteriyel savunma, anjiogenez ve kollagen sentezi için şart olduğu bilinmektedir. Hipoksemik durumlarda yara iyileşmesinin yetersiz kaldığı deneysel ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir (127). Oksijen taşıma kapasitesinin azalması ile birlikte anemi, büyüyen dokulara ihtiyacından daha az kan gelmesine bağlı olarak laktik asit gibi anaerobik metabolizma ürünlerinin birikmesine neden olmaktadır (128). Bu durum da NEK gelişiminde olası bir neden olarak belirtilmektedir.

Aneminin dışında da polisitemi ve hiperviskozitenin de bağırsak perfüzyonunun bozulmasına bağlı olarak NEK'e neden olabileceği düşünülmektedir. Köpek yavrularına transfüzyon yapılarak hipervolemik polisitemi oluşturulduğu bir çalışmada; deneklerin bağırsaklarında NEK ile uyumlu histopatolojik değişiklikler gösterilmiştir (129). Başka bir deneysel çalışmada da, hiperviskoziteye bağlı olarak intestinal iskemi geliştiği ortaya konulmuştur (130).

2.1.2 Risk Faktörleri

2.1.2.1 Prematürite ve Düşük Doğum Ağırlığı

Son yıllarda infertil olan çiftlerin in vivo ve invitro yöntemlerle bebek sahibi olma oranlarının ve ileri yaşta hamilelik oranlarının artması, düşükle sonuçlanabilen hamileliklerin sürdürülebilmesi gibi gelişmeler preterm doğum oranlarını arttırmıştır (3). Prematür doğum oranları sanayileşmiş olan toplumlarda 1996'da %0.87 iken 12 yıl içinde %1.1'e çıktığı gösterilmiştir (131). Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırması sonuçlarına göre, Türkiye'de düşük doğum ağırlıklı bebeklerin oranı ise %11'dir (132).

NEK gelişimi ve gestasyonel yaş arasındaki ters ilişki bilinmektedir ve teknolojideki tüm gelişmelere, tedavi protokollerindeki iyileşmelere rağmen, ülkeden ülkeye düşük doğum ağırlıklı bebeklerde NEK görülme sıklığı değişmektedir (1). İki ayrı sanayileşmiş olan toplumu kıyaslayan çalışmada NEK gelişme sıklığı ve tedavi sonuçları farklılık göstermektedir (133). Ülkemizde çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerin mortalitesi ile ilgili çok merkezli araştırmada doğum ağırlıkları 500-749 gram olan bebeklerde mortalite %70'dir. Doğum ağırlığının 750 gramdan sonra her 250 gramlık artışta mortalite %45, %21, %10 olarak azalmaktadır (134). Tüm preterm veya çok düşük doğum ağırlıklı (<1500gr) bebeklerin yaklaşık %5'ini, 1000 gram altı

bebeklerin ise %10'unu NEK etkilemektedir (3). Bu durum immatür mukozal bariyer, mukozal enzimler ve çeşitli gastrointestinal hormonların regülasyon bozukluğu ile birlikte diğer sekonder nedenlere bağlanmaktadır.

2.1.2.2 Enteral Beslenme

Enteral beslenme ile NEK gelişimi arasında ilişki olduğu bilinmektedir. Yapılan gözlemlerde, NEK gelişen bebeklerin %90-95'inin en az bir defa beslendiği tespit edilmiştir (135). Enteral besleme enterik patojenlerin proliferasyonu için gereken substratları sağlaması, anne sütüne göre hiperosmolar olması nedeniyle NEK için suçlanmaktadır (136).

Anne sütü içerdiği lokal büyüme faktörleri gibi immunprotektif etkili maddelerle NEK riskini anlamlı ölçüde azaltmaktadır. Üstelik, enteral IgA ve IgG içerikli beslemeyle yapılan klinik çalışmalarda NEK riskinin azaldığı gösterilmiştir (137). Anne sütünün osmolaritesi yaklaşık 300 mOsm/kg iken formula mamalarda bu değer 400 mOsm/kg olduğu bildirilmektedir. Yüksek osmolariteli beslenmede yüksek konsantrasyonda bulunan solüt maddelerin direkt intestinal mukozal hasara yol açarak NEK'i kolaylaştırdığı ileri sürülmektedir (136).

2.1.2.3 Bakteriyel Kolonizasyon

Hastanede yatan preterm bebekler ve term bebekler ile anne sütüyle beslenen bebeklerin intestinal mikrobiyal floralarının belirgin farklılık gösterdiği bilinmektedir (138). Prematüre bebeklerde term doğan ve anne sütü ile beslenen bebeklerde kolonize olan *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türlerinden daha baskın olarak *Klebsiella*, *Enterobacter* ve *Clostridia* gibi patojen bakterilerle mikrobiyal floranın meydana geldiği ileri sürülmektedir. Kolonize olan bakteri türünün patojenik ya da kommensal olması NEK patogenezinde önemli olduğu bilinmektedir (139). Sepsis, NEK'li bebeklerin %20-40'ında gösterilmiştir. En sık üretilen mikroorganizmalar *Enterobacteriaceae sp.*, *Clostridia sp.*, *Staphylococcus sp.*, virüsler ve mantarlardır. Bakteriyel enfeksiyonlarla ilişkili olabilmesine rağmen, bakterinin epitelyum yapıyı bozması ve submukozaya geçerek dolaşıma erişmesinin de NEK'te etkili olduğu öne sürülmüştür (2).

2.1.2.4 Hipoksik-İskemik Durumlar

Hipoksik-iskemik durumlarda NEK riskinin artmasında olası mekanizma; daha önce bahsi geçen “dalış refleksi” olarak da adlandırılan kan akımının daha az vital organlardan tercihen kalp ve beyine gitmesidir. Hastalık esas olarak prematür bebeklerde görülsede, NEK gelişen term bebeklerde siyanotik konjenital kalp hastalığı veya by-pass cerrahisi gibi hipoksik veya iskemik durumların birlikteliği saptanmıştır (140). Pretermilerin bağırsakları iskemik durumlara karşı daha duyarlı olsa da term ve terme yakın infantlarda hipoksik iskemik durumlar daha sık rol oynadığı bildirilmektedir. Perinatal asfiksi gibi sirkülatuar stres durumlarında kan splanknik dolaşımdan uzaklaştırılmaktadır. İntestinal iskemiye takip eden reperfüzyon bağırsak hasarı oluşturur. Vazodilatatör (Nitrik oksit ve diğerleri) ve vazokonstrüktör (Endotelin-1 ve diğerleri) moleküller arasındaki imbalans splanknik kan akımının otoregülasyonunu bozmaktadır. NEK gelişen term bebeklerde hayatın ilk gününde yapılan Doppler incelemede süperior mezenter arterde yüksek akım direnci gösterilmiştir. Benzer şekilde konjenital kalp hastalığı olan bebeklerde bağırsak perfüzyonu tehlikeye girerek iskemik hasar kolaylaşır. PDA'nın diastolik kaçığa bağlı olarak splanknik perfüzyonun azalttığı ve buna bağlı olarak NEK riskini artırdığı bildirilmektedir (141).

2.1.3 Klinik

Preterm bebeklerde NEK başlangıcı enteral beslenmenin başlangıcını takiben genellikle 14-20. günlerde tespit edilir. Bunun aksine, term bebeklerde NEK gelişimi genellikle hayatın ilk haftasındadır (135). İlk ortaya çıkan semptomlar yavaş ilerleyen beslenme intoleransı ve hafif sistemik belirtilerdir. Erken dönemde stabil olmayan vücut ısısı değişiklikleri, apne, bradikardi mevcut iken, sonraki dönemde fulminan sistemik kollaps ve tüketim koagülopatisi ortaya çıkmaktadır. Klinik bulgular; gastrointestinal bulgularla seyreden hafif bir hastalık olabileceği gibi, ani başlangıçlı ve fulminan seyirli dolaşım yetmezliği, respiratuar ve metabolik asidoz, gaitada gross kan, DIC ve multiorgan yetmezliği ile giden şiddetli hastalık tablosu şeklinde de kendini gösterebilmektedir. Şiddetli vakalarda intestinal perforasyon, peritonit ve şok görülebilmektedir (142). Bunlardan başka bağırsakta invajinasyon, ileus ve volvulus

gibi akut batın kliniğine sebep olabilen durumların da eşlik edebileceği bildirilmektedir (143).

İntestinal perforasyonun NEK sürecinde meydana gelebilmekle birlikte değişik nedenlerle spontan intestinal perforasyon olarak adlandırılan durumlarla da ortaya çıkabileceği bilinmektedir. Spontan intestinal perforasyon genellikle 1000 gram altı yenidoğanlarda ve 26 gebelik haftasından küçük bebeklerde yaşamın ilk yedi gününde meydana gelmekte ve NEK'in aksine, spontan intestinal perforasyon (SİP) gelişen bebeklerde sistemik radyolojik ve histolojik bulguların olmadığı ileri sürülmektedir (144). Umblikal kateter yerleştirme ve intestinal kas yapısındaki defektlere bağlı olarak da SİP geliştiği bilirse de bu kliniğe en sık sebep olan durumların postnatal indometazin veya deksametazon kullanımı olduğu tahmin edilmektedir (145). NEK ve SİP'in mortalite ve morbiditelerinin benzer olduğu bildirilmiştir (146).

Yoğun bakım ünitelerinde yatan veya cerrahi girişim uygulanan hastaların bir çoğunda batın içi basıncın arttığı daha önce bildirilmiştir. Abdominal kompartman sendromu olarak tanımlanan bu patoloji abdominal organların hipoperfüzyonuna sebep olur (147). Tanrıverdi ve ark (147) yakın zamanda yaptıkları çalışmalarında NEK kliniğinde artan batın içi basınçla birlikte intestinal iskemi ve nekrozun ilerlediğini ileri sürmüşlerdir. NEK gelişen bebeklerde günde iki defa ölçülen intravezikal basıncın anlamlı olarak yüksek olduğunu, seri intravezikal basınç ölçümleri ile NEK'in erken tanısı ve hastalık seyrinin öngörülmesinin mümkün olabileceğini bildirmişlerdir.

Uygun tedavi yaklaşımları ile iyileşen NEK vakaları olsa da, bunların önemli bir kısmında intestinal obstruksiyon, kısa bağırsak sendromu, karaciğer yetmezliği gibi komplikasyonlara ek olarak uzun süreli total parenteral beslenmeye bağlı problemlerin de hastaları etkilediği bildirilmektedir (148).

2.1.4 Evreleme

NEK'in klinik olarak doğrulanması ve progresyonunun belirlenmesi sistemik, gastrointestinal ve radyografik bulgularla kategorize edilen "Bell kriterleri" olarak bilinen evreleme ile yapılır (135). **Tablo 2.1'**de klinik, laboratuvar ve radyolojik bulgulara göre Bell evrelemesi görülmektedir.

Tablo 2.1 NEK evrelemesinde kullanılan Bell kriterleri (135)

a) Evre I, şüpheli hastalık

- Nonspesifik sistemik bulgular (apne, bradikardi, ısı düzensizliği, letarji)
- Beslenme intoleransı, tekrarlayan mide rezidüleri, abdominal distansiyon
- Nonspesifik ya da normal radyolojik bulgular

b) Evre II, belirgin hastalık

- Evre I'e ek olarak abdominal hassasiyet ve trombositopeni
- İlerlemiş abdominal distansiyon, bağırsak sesleri yokluğu
- Bağırsak duvarında ödem, assit varlığı, gaitada kan pozitifliği
- Özel radyolojik bulgular (pneumatisis intestinalis, portal vende gaz)

c) Evre III, ilerlemiş hastalık

- Hipotansiyon, respiratuar ve metabolik asidoz, solunum yetersizliği, azalmış idrar çıkışı, nötropeni ve DIC
 - Yaygın batın duvarı ödemi, endurasyon ve batında renk değişiklikleri
 - İlerlemiş radyografik bulgular (pneumoperitoneum)
-

2.1.5 Tanı

Risk faktörlerinden birine veya daha fazlasına sahip olan NEK şüpheli vakalarda radyolojik ve laboratuvar incelemeler yapılmalıdır. Beslenme intoleransı, abdominal distansiyon, gaitada kan tespit edilen hastalar NEK ön tanısı ile takibe alınır, bunlar neonatal sepsisin erken bulguları da olabilir (135).

A. Laboratuvar İncelemeler

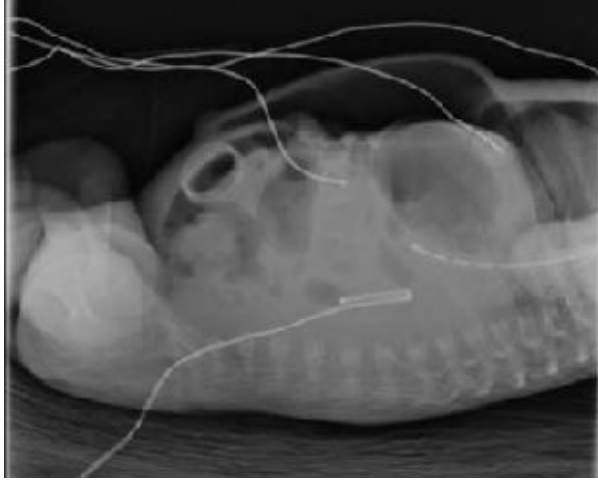
1. **Tam kan sayımı.** Lökosit sayısı normal olabilmekle birlikte sıklıkla sola kayma veya lökopeni görülebilir. Trombositopeni siktir. NEK'li hastaların yarısında trombosit 50.000 in altında bulunur.

2. **C-Reaktif Protein.** İnfantların efektif enflamatuvar cevap üretmemesinden dolayı başlangıçta yükselmeyebilir.
3. **Kültürler.** Olası bakteriyel, viral ve fungal patojenlerin tespiti için kan, idrar, gaita ve spinal sıvı kültürleri gönderilebilir.
4. **Elektrolitler.** Hiponatremi, Hipernatremi ve hiperkalemi sık olmak üzere elektrolit imbalansı görülebilir.
5. **Arter kan gazı.** Metabolik veya kombine respiratuvar ve metabolik asidoz
6. **Koagulasyon parametreleri.** Trombositopeni veya kanama mevcutsa geniş koagulasyon çalışması yapılmalıdır. Uzamış protrombin zamanı, uzamış parsiyel tromboplastin zamanı, azalmış fibrinojen ve artmış fibrin yıkım ürünleri dissemine intravasküler koagulasyona gidişi ortaya koyar.

İnsan nötrofillerinde kalsiyum ve çinko bağlayan bir protein olan “kalprotektin” seviyesinin NEK tanısı konmuş bebeklerde yükselmiş olduğu gösterilmiştir. Fekal kalprotektin ölçümünün NEK’in tanısı ve şiddetini belirlemede yardımcı olabileceği ileri sürülmektedir (149).

B. Radyografik Çalışmalar

1. **Düz karın grafisi.** Anormal bağırsak gazı varlığı, ileus, genişlemiş bağırsağa ait sentinel loop görülebilir. Eğer Pnomatosis intestinalis ve/veya intrahepatik portal vende gaz varsa NEK tanısı doğrulanır. Pnömatosis intestinalis, NEK’in patogonomik radyolojik görüntüsüdür. Bu bulgunun, bakterilerin intestinal penetrasyonunun ardından intramural bölgede gaz üretmeleri ile ortaya çıktığı tarif edilmektedir. Klinik ilerledikçe pnömatosis splanknik damarlar boyunca ilerleyip portal vende hava görüntüsüne neden olabileceği bilinmektedir (150). Fikse (sabit) intestinal loop görüntüsü 24 saatten uzun süre mevcut ise ilgili segmentte transmural nekroz geliştiği ileri sürülmektedir (143).
2. **Lateral dekübit grafisi.** Serbest hava görüntüsü intestinal perforasyonun bildiricisidir. Her 6-8 saatte tekrarlanan radyografik çalışmalarla pnomatosis intestinalis veya portal vende gaz görüntüsü takip edilebilir. Bunlar pnomoperitonyumun artmış riskine dalalet eder. Klinik gelişme ile 48-72 saat sonra seri radyolojik çalışmalar kesilmelidir (**Şekil 2.9**).



Şekil 2.9 Lateral grafide intestinal perforasyon gelişen NEK vakasında batın içi serbest gaz görülmektedir (143).

3. **Batın Ultrasonografisi.** Nonspesifik klinik ve radyolojik bulguların tespiti ve medikal tedaviye cevap vermeyen NEK'li infantlarda ultrasonografik inceleme faydalı olabilir. Perforasyonda radyografik olarak görülemeyen serbest gaz ve fokal sıvı birikimleri ultrasound ile gösterilebilir.
4. **Abdominal parasentez.** Assit veya peritoniti olan, klinik ilerlemesi olmayan infantlarda peritoneal kaviteden USG eşliğinde iğne ile alınan sıvıda gram boyama ve kültür incelemesi yapılabilir.

Etkilenen bağırsak açıkça şişmiş, gri veya yeşilimsi gri renktedir, bununla birlikte koyu mor veya geniş kanamalı siyah renkte de olabilir. Yumuşak ve frajil hale gelen duvar transmural delinebilir. Perforasyon, normal ve nekrotik bağırsak dokuları arasındaki bileşkede meydana gelme eğilimindedir. Ancak bazen ölü bölgenin ortasında, bazen de birden fazla noktada görülebilir (7).

2.1.6 Tedavi

NEK şüphesi veya tanısı konulduğunda erkenden ve agresif biçimde tedaviye başlanması önerilmektedir. Başlıca yapılması gerekenlerin yoğun sıvı tedavisi (20 cc/kg/gün), nazogastrik dekompresyonla bağırsakların rahatlatılması, anemi ve trombositopeninin düzeltilmesi olduğu bildirilmiştir (6). Gastrointestinal rahatlama için 7-14 gün boyunca oral beslenme kesilmesi önerilse de, Evre I NEK vakalarında bu süre daha kısa tutulabilir. Bazal beslenme ihtiyacını karşılanması için total parenteral

beslenme başlanmalıdır. Tüm gastrik rezidü içerikleri ve gaita numuneleri kan gizli kan tetkiki ile incelenmelidir (135). Varsa umbilikal arteriyel ve venöz kateterler çıkarılmalı, periferde arteriyel ve venöz kateter takılıp kullanılmalıdır (135). Ayakta direk batın grafileri her 6-12 saatte bir tekrarlanmalıdır. Solunum yetmezliğinde hasta ventilatöre bağlanmalı ve hipotansiyonu inotropik ajanlarla regüle edilmelidir. Bu amaçla düşük dozda dopamin, 3-5 µgr/kg/dk ve dobutamin kullanılabilir (6). Hiperkalemi veya anüri varlığında mayii içerisindeki potasyum kaldırılmalı, metabolik asidoz kan gazı takipleri ile yakından izlenmeli ve düzeltilmelidir (135). Antibiyotik tedavisine başlamadan önce kan ve idrar kültürleri alınmış olmalı, parenteral antibiyotik tedavisi 10-14 gün boyunca verilmesi, profilaktik olarak ampisilin ve gentamisin (veya sefotaksim) ile başlanması önerilmektedir. Stafilokokkal enfeksiyon şüphesi varsa ampisilin yerine vankomisin tedavisi göz önünde bulundurulması önerilmektedir. Şüpheli peritonit veya bağırsak perforasyonu varsa metronidazol veya klindamisin gibi anaerobik etkili antibiyotikleri eklenmelidir (135).

Enteral beslenmeye tercihen anne sütü ile başlanması, bu yoksa hipotonik konsantrasyonda mamalar ile beslenmesi önerilmektedir. Beslenme zamanı uzun tutulması ve küçük miktarlardan başlanması, klinik stabil hale gelene kadar 12-24 saat ara ile tam kan sayımı ve elektrolit paneli kontrol edilmesi tavsiye edilmektedir (135). Lüzum halinde eritrosit ve trombosit transfüzyonu yapılabileceği, Evre II ve III hastalarda DIC gelişebileceğinden taze donmuş plazma ve kriyopresipitat gereksinimi olabileceği bildirilmektedir (135).

Pnömoeritoneum varlığı, maksimum medikal tedaviye rağmen klinik kötüleşmenin devam etmesi, intestinal obstruksiyonla birlikte ele gelen abdominal kitle ve intestinal striktür gelişmesi cerrahi girişim için kesin endikasyonlar olarak tanımlanmaktadır (151). Relatif endikasyonları ise portal venöz gaz, batın duvarında sellülit varlığı, radyografide fiks dilate intestinal segment, medikal tedaviye rağmen klinikte kötüye gidiş olarak bildirilmektedir (135). Acil cerrahi tedavi gerektiren en temel endikasyon, intestinal perforasyondur ve en sık terminal ileumda görülmektedir (152). Cerrahi tedavi iki aşamalıdır. İlk operasyonda nekrotik bağırsak bölgesi rezeke edilerek proksimal ucu dışarı ağızlaştırılmakta ve klinik daha iyi duruma geldikten sonra ikinci girişimde reanastomoz uygulanmaktadır (151).

2.1.7 Korunma

NEK gelişiminde ve ilerlemesinde etkisi kanıtlanmış asıl iki faktörün prematurite ve beslenme olduğu bildirilmektedir. NEK gelişen bebeklerin büyük kısmının enteral olarak beslenmiş olduğu ve anne sütü yerine formula mama ile beslenen bebeklerde NEK riskinin artmış olduğu kanıtlarla gösterilmiştir (153). NEK ve bağırsağın invaziv enfeksiyonları dahil, immatür “gut” mukozasıyla birlikte olan durumlarda immunprotektif ve büyüme faktörlerinin sağlanması nedeniyle anne sütünün faydalı olduğu tahmin edilmektedir (137). İnvazif enfeksiyonlar ve NEK gelişiminin önlenmesi için preterm bebeklerde anne sütü ile beslenme önerilmektedir (154). Anne sütü ile beslenemeyen bebeklerde lümen içeriği ve bakteri çoğalmasına bağlı olarak bağırsak motilitesi azalmaktadır (2). Preterm ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerde formula ile beslemede anne sütü ile beslenmeye göre daha iyi büyüme sonuçları olsa da NEK gelişiminde daha yüksek risk taşıdığı gösterilmiştir (153). NEK’i önlemek veya minimize etmek için standart beslenme rejimlerinin önemli bir aracı olabileceği düşünülmüştür (155). Berseth ve ark. (156) çok düşük doğum ağırlıklı bebeklerde küçük hacimli erken beslenmeye başlamanın daha geç başlanan beslemeyle karşılaştırıldığında NEK sıklığını azalttığını bildirmişlerdir. Bolus dozlarında aralıklı sütle beslenme ve nasogastrik tüple sürekli beslemenin karşılaştırıldığı diğer bir çalışmada ise bebeklerin kilo alımı ve NEK gelişimi açısından anlamlı fark bulunamamıştır (157). Enteral beslenmenin yavaş ilerletilmesi beslenmede yetersiz kalınmasına ve yatış süresinin uzamasına neden olurken, hızlı beslenme ise artmış NEK riski ile ilişkili bulunmuştur (2). Kennedy ve ark (158) yaptıkları sistemik derlemede hızlı ve yavaş besleme arasındaki farkları inceledikleri çalışmada NEK açısından iki grup arasında anlamlı fark bildirmemişlerdir.

Yenidoğanlarda özellikle IgA olmak üzere immunglobulinlerin seviyelerinin düşük bulunmasından dolayı, immunglobulinlerin NEK’e karşı koruyucu etkileri olabileceği düşünülmektedir (159). Fast ve ark (160) 200 yüksek NEK riski taşıyan yenidoğan üzerinde yaptıkları çalışmada oral gentamisin tedavisinin oral IgA/G tedavisine göre daha etkili olduğunu göstermişlerdir. Buna karşın, bu çalışmanın da dahil edildiği üç serbest çalışmanın Cochrane derlemesinde (n=2095) oral IgG veya IgG/IgA kombinasyonunun NEK insidansında azalma, cerrahiye gidiş, NEK’e bağlı mortalite açısından anlamlı sonuç elde edilememiştir (161).

Laktoferrin, kolostrum ve anne sütünde bol miktarda bulunan, memelileri enfeksiyonlara karşı doğuştan koruyan, antimikrobiyal özellikte bir glikoprotein olarak tanımlanmaktadır. Gram pozitif koklar, gram negatif basiller ve candida türlerine karşı geniş mikrobisidal aktivitesi olduğu bildirilmektedir (162). Gastriontestinal enfeksiyonlara ve intestinal hasara karşı da koruyucu olabileceği düşünülen laktoferrinin hayvan modellerinde bağırsak ortamında bakteriyel translokasyonu azalttığı ileri sürülmektedir (163). İnsan ve sığır laktoferrin molekülleri arasında ileri derecede benzerlik olduğu bildirilmektedir. Manzoni ve ark (164) ortalama doğum ağırlığı 1100 gram olan düşük doğum ağırlıklı bebeklerde yaptıkları çalışmada *Lactobacillus rhamnosus* ile kombine sığır laktoferrini verilen grupta NEK insidansının azaldığını ortaya konulmuştur.

Plazma arginin konsantrasyonları NEK’li bebeklerde daha düşük bulunmuştur. Argininin etkisinin incelendiği bir çalışmada arginin desteği ile NEK gelişiminin anlamlı ölçüde azaldığı bildirilmiştir (165). Ancak yazarlar tedavide argininin rutin eklenmesi için verilerin yetersiz olduğu sonucuna varmıştır (2). Glutamin anne sütünde bol miktarda, inek sütünde oldukça düşük seviyede bulunurken, standart formula mamalarda bulunmayan bir amino asittir (162). Kritik hastalarda glutaminin esansiyel aminoasit haline gelebileceği, metabolik yakıt olarak rol oynadığı ve bağırsağın fonksiyonel bütünlüğünü koruduğu bildirilmektedir (166). Deneysel NEK modeli bir çalışmada glutamin desteğinin mukozal hasarı ve invaziv enfeksiyonlara bağlı ölüm riskini azalttığı ileri sürülmektedir (162). Bununla birlikte, beş serbest çalışmanın dahil edildiği Cochrane derlemesinde glutamin alan bebeklerde NEK sıklığı açısından anlamlı azalma bulunmamıştır (167).

Güçlü anti-enflamatuar özelliği bulunan “puninik asit”in başlıca kaynağı olan nar çekirdeği yağının, deneysel NEK modelinde intestinal proliferasyon, sitokin regülasyonu üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Yenidoğan ratların hipoksi ve hipotermiye maruz bırakıldığı çalışmada sadece formula mama ile beslenenlerde NEK insidansı %61 iken, nar çekirdeği yağı ile desteklenmiş formula mama verilen yavrularda NEK insidansı %26 olarak bulunmuştur. Ayrıca nar çekirdeği yağı verilen ratlarda enterosit proliferasyonunun daha iyi derecede olduğu ve formula mama ile

beslenenlerdeki IL-8, IL-12, IL-23 ve TNF- α düzeylerindeki artışın görülmediği bildirilmektedir (168).

Doğumda steril olan insan bağırsağı beslenme ile kolonize olduğu, ancak yoğun bakımda takip edilen ve antibiyotik kullanılan bebeklerde kommensal organizmalar yerine patojenlerin florayı işgal ettikleri tahmin edilmektedir. Ayrıca mama ile beslenen premature bebekler anne sütü ile beslenenlerle karşılaştırıldıklarında bağırsak kolonizasyonlarında farklılıklar da bildirilmektedir (2). Sağlıklı term bebeklerde doğumdan hemen sonra anneye ait vaginal floradan bağırsakların kolonizasyonu başlamaktadır. Anne sütü ile beslenen bebeklerde *Bifidobacterium* türleri postnatal birkaç haftaya kadar florada dominant kalmaktadır. Preterm bebeklerde ise yoğun bakım üniteleri, antibiyotik kullanımı, gecikmiş beslenme ve anne sütü ile yetersiz beslenmeye bağlı olarak intestinal florada anormal kolonizasyon gerçekleşmektedir (166). Probiyotiklerin bağırsak mukozası üzerinden bakteri migrasyonunu engelleyip patojenik flora ile rekabet ederek ve konağın mikrobiyal ürünlerine karşı vereceği cevabın modifikasyonu üzerinden NEK gelişimine karşı koruyucu olabileceği düşünülmektedir (166). Lin ve ark (169) evre-II ve üzeri NEK kliniği olan 180 infanta oral *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium infantis* vererek yaptıkları çalışmada probiyotik eklenerek verilen anne sütünün NEK in sıklık ve şiddetini azalttığını ileri sürmüşlerdir. Ayrıca, çalışma grubu hastalarında alınan kan kültürlerinin hiçbirinde *Lactobacillus* veya *Bifidobacterium* üremesi olmadığını da bildirmişlerdir (169). Oral antibiyotik verilmesinin NEK insidansını azaltabileceği bildirilmektedir (170). Malezyada NEK gelişen 222 vakanın risk faktörlerinin incelendiği bir çalışmada intrapartum antibiyotik verilen vakalarda NEK sıklığının daha az olduğu gösterilmektedir (171). Ancak, bu uygulamaya bağlı olarak dirençli bakterilerin kolonizasyonunun artabileceği düşünülmektedir (162). Jiang ve ark. (172) preterm domuz yavrularında yaptıkları deneysel NEK modeli çalışmalarında antibiyotik tedavisinin bakteriyel kolonizasyonu ve bakteri ilişkili anti-enflamatuar yanıtları azaltmasıyla preterm bebeklerde kolonizasyon ilişkili NEK'i sınırlayabileceğini öne sürmüşlerdir. Buna rağmen NEK profilaksisi için rutin antibiyotik kullanımı önerilmemektedir (162). Risk faktörleri bulunan gebelere antenatal steroid tedavisi verilmesiyle respiratuar distress, intrentriküler hemoraji ve NEK sıklığının azaldığı da ileri sürülmektedir (173).

3. MATERYAL VE METOD

Araştırma için Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvan Araştırmaları Etik Kurulu'ndan onay alındı (EK-1). Etik kurulu kararından sonra KSÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığından destek temin edildi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Deneysel Hayvan Araştırma Laboratuvarı'ndan deneysel hayvanlar olan *Sprague Dawley* cinsi sıçanlar temin edildi. Seçilen sağlıklı sıçanlar normal ortamlarda çiftleşmeleri için bekletildi ve çiftleşen hayvanlar gruptan ayrılılarak normal hamilelik sürelerinin sonlanmasına kadar normal beslenmelerine devam edilmesi sağlandı. Çiftleşmeden sonraki hamilelik süresinin sonunda aynı anneden normal yolla yenidoğan sağlıklı sıçan yavruları deneysel amaçla kullanıldı. Deneysel amaçla 5 farklı grup oluşturuldu (G_{1-5}). Anneler gruplandırılarak random sırayla deneysel çalışmada yavruları kullanıldı. Denekler **Tablo 3.1**'de görüldüğü şekilde sınıflandırıldı.

Tablo 3.1 Beslenme içeriklerine göre grupların özellikleri

G₁	Anne sütüyle beslenen ve herhangi bir strese maruz bırakılmayan kontrol grubu
G₂	NEK protokolü uygulanan ve anne sütü ile beslenmeye devam edilen kontrol grubu
G₃	NEK protokolü uygulanan ve insan AS ile beslenen grup
G₄	NEK protokolü uygulanan ve sadece formüle ile beslenen grup
G₅	NEK protokolü uygulanan ve insan AS ile hazırlanmış formüle mama ile beslenen grup

Gruplara alınma ve gruptan çıkarılma kriterleri **Tablo 3.2**'de gösterilmiştir. Toplamda 5 gebe sıçandan 47 yavru elde edildi. İlk anneden (G_1) 7, ikinci anneden (G_2) 9, üçüncü anneden (G_3) 11, dördüncü anneden (G_4) 10 ve beşinci anneden (G_5) 10 adet yavru doğdu (**Şekil 3.1**).

Tablo 3.2 Gruplara dahil edilme ve çıkarılma kriterleri

G ₁ ;	<p>Deneye alınma kriterleri</p> <ul style="list-style-type: none">• Miadında doğanlar• Renkleri, tonus ve aktiviteleri normal olanlar• Hipoksik öyküsü olmayanlar• Emme refleksleri iyi ve yeterli olanlar <p>Deneyden çıkarılma kriterleri</p> <ul style="list-style-type: none">• Hipoksik doğum öyküsü olanlar• Beslenmeden önce eksitus olmuş hayvanlar• Beslenemeyenler• Hastalığa ait klinik bulgusu olanlar• Enfeksiyon bulguları olanlar
G ₂ ;	<p>Deneye alınma kriterleri</p> <ul style="list-style-type: none">• Miadında doğanlar• Renkleri, tonus ve aktiviteleri normal olanlar• Hipoksik öyküsü olmayanlar• Emme refleksleri iyi ve yeterli olanlar <p>Deneyden çıkarılma kriterleri</p> <ul style="list-style-type: none">• Hipoksi oluşturulamayanlar• Hipoksik doğum öyküsü olanlar• Anne sütü alamayanlar• Beslenmeden önce kaybedilenler• Enfeksiyon bulguları olanlar• Başka bir besin ögesiyle beslenenler
G ₃ ;	<p>Deneye alınma kriterleri</p> <ul style="list-style-type: none">• Miadında doğanlar• Renkleri, tonus ve aktiviteleri normal olanlar• Hipoksik öyküsü olmayanlar• Emme refleksleri iyi ve yeterli olanlar <p>Deneyden çıkarılma kriterleri</p> <ul style="list-style-type: none">• Hipoksi oluşturulamayanlar• Hipoksik doğum öyküsü olanlar• AS ile beslenemeyenler• Beslenmeden kaybedilenler• Başka besin ögeleri verilenler• Enfeksiyon bulguları olanlar
G ₄ ;	<p>Deneye alınma kriterleri</p> <ul style="list-style-type: none">• Miadında doğanlar• Renkleri, tonus ve aktiviteleri normal olanlar• Hipoksik öyküsü olmayanlar• Emme refleksleri iyi ve yeterli olanlar <p>Deneyden çıkarılma kriterleri</p> <ul style="list-style-type: none">• Hipoksik doğum öyküsü olanlar• Formüla mama almayanlar• Beslenmeden önce kaybedilenler• Enfeksiyon bulguları olanlar• Başka bir besin ögesiyle beslenenler
G ₅ ;	<p>Deneye alınma kriterleri</p> <ul style="list-style-type: none">• Miadında doğanlar• Renkleri, tonus ve aktiviteleri normal olanlar• Hipoksik öyküsü olmayanlar• Emme refleksleri iyi ve yeterli olanlar <p>Deneyden çıkarılma kriterleri</p> <ul style="list-style-type: none">• Hipoksik doğum öyküsü olanlar• Formüla mama almayanlar• Beslenmeden önce kaybedilenler• Enfeksiyon bulguları olanlar• Başka bir besin ögesiyle beslenenler



Şekil 3.1. Doğumdan hemen sonra yenidoğan sıçanlar görülmektedir.

G₁. yenidoğan sıçanlar normal beslenmeye bırakıldı. Herhangi bir strese maruz kalmaları engellendi. Normal şartlarda annesiyle birlikte aynı kafeste kalmaları sağlandı. Genel durumu kötüleşen yavruların çalışma dışı bırakılması planlanmıştı, ancak hiçbir yavru da bu gözlenmedi. Yavrular günlük olarak tartılarak notlar alındı ve doğumdan sonraki 96. saatlerinde ketamin sedasyonu altında sakrifiye edildi. Hemen sonrasında mideden anüse kadar gastrointestinal sistemleri çıkarıldı, biyopsiler alınarak kalan bağırsak kısımları homojenat elde edilmek üzere ayrıldı.

G₂ grup sıçanlar ise doğumlarından hemen sonra annelerinden beslenmemeleri için ayrılarak Arçelik® 4252 NY model buzdolabında dijital termometre ile ısı ölçümü yapıldıktan sonra buzdolabı ısısı +4°C sıcaklıkta iken 10 dakika süre ile hipotermiye maruz bırakıldı. Buzdolabından çıkarılan yavrular 2L hacminde cam kavanoza alındı, hava sızdırmaz özellikte olan iki girişli kapağı ile kapatıldı. Bilser® BA-6 cerrahi aspiratör cihazı ile kapak üzerinde bulunan ilk girişten kavanoz içi hava 0.08 MPa kadar aspire edildi. Hemen sonrasında kapak üzerindeki diğer girişe bağlı olan sistemden %100 nitrojen gazı ortamın hava basıncına eşit hale gelene kadar gönderildi. (Şekil 3.2). Kavanoz içindeki yavrular gözlenerek 1 dakika boyunca hipoksi sağlandı. İşlem sırasında yavruların siyanoze olduğu gözlemlendi (Şekil 3.3 ve 3.4). Hipotermi ve hipoksi süreleri kronometre ile takip edildi. Bu grupta bulunan deneklere tarif edilen NEK protokolu 12 saat ara ile 96 saat boyunca uygulandı. Günde 2 defa yapılan işlem

haricinde yavrular annelerinin yanında bırakıldı ve normal şekilde anne sütü ile beslenmeleri sağlandı.



Şekil 3.2 Hipoksi oluşturmada kullanılan aspiratör ve nitrojen gazı.



Şekil 3.3 ve 3.4 Hipoksi öncesi (solda) ve sonrası (sağda) yavrular görülmektedir. Yavrularda siyanoze renk değişikliği dikkat çekmektedir.

G₃ grup sıçanlar doğumlarından hemen sonra beslenmemeleri için annelerinden hemen ayrıldı. G₂ de bahsedilen NEK protokolu bu gruba da 12 saat ara ile uygulandı. Beslenmeleri 4 saat ara ile 0,1 ml hacminde insan AS ile yapıldı. Beslemeler için iğne kısımları çıkarılan Novacath® 24Gx19mm intraketlerin silikon uçları ve 1 ml hacminde insulin enjektörleri kullanıldı (**Şekil 3.5**). Başları hiperekstansiyona getirilmesiyle ağızlarını açan yavruların midesine intraket uçları yerleştirildi. Beslenmelerin aksamaması için çalışma süresince laboratuarda kalındı ve çalar saatten yararlanılarak beslenme aralıklarına sadık kalındı. Beslemelere 96 saat devam edildi. Annelerinden ayrı kafeslerde takip edilen deneklerin uygun ortam sıcaklık ve nem şartlarında kalmaları sağlandı.



Şekil 3.5 Beslemelerde kullanılan insulin enjektörü ve intraket ucu.

G₄ grup sıçanlar da G₃'de bahsedildiği gibi doğumdan hemen sonra beslenmemeleri için annelerinden ayrıldı. Hipoksi ve hipotermiye maruz bırakılarak NEK protokolu doğumdan hemen sonra ve takip eden süre içinde her 12 saatte bir uygulandı. Beslenmeler için G₃'de tarif edilen teknik ile 4 saatte bir 0,1 ml hacminde 1 numaralı Bebelac® formula mama kullanıldı.

G₅ grup sıçanlar da G₃'de bahsedildiği gibi doğumdan hemen sonra beslenmemeleri için annelerinden ayrıldı. Doğumdan hemen sonra hipoksi ve hipotermiye maruz bırakılarak NEK protokolu uygulanan sıçanlara takip süresi içinde

her 12 saatte bir bu işlem tekrar edildi. Beslenmeler için insan AS ile hazırlanmış 1 numaralı Bebelac ® formula mama kullanıldı. Beslenme içeriği 30 cc hacminde insan ASna 1 ölçek mama katılarak hazırlandı. G₃'de bahsedilen teknik ile 4 saatte bir 0,1 ml hacminde beslenmeye devam edildi.

Amnion Sıvısı Vericisinin Seçimi

Çalışmada insan AS kullanılması için Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alındı (EK-2). AS vericisi olan gebe seçiminde koryoamnionitis, preklampsi, erken membran rüptürü, gestasyonel diabetes mellitus, hipertansiyon olmaması, gebelik süresince iyi takip edilmiş ve problemsiz gebelik geçirmiş olmamasına dikkat edildi. Mükerrer C/S nedeniyle C/S yöntemi ile gerçekleşen doğumdan elde edilen AS kullanıldı. Alınan ASnın temiz ve berrak görünümde olmasına, mekonyumlu veya kanlı olmamasına dikkat edildi. Enfekte olmadığından emin olunması için ASndan biyokimyasal incelemeler, hücre sayımı ve C-Reaktif Protein tetkikleri için numuneler alındı. AS alınımından önce seçilmiş olan bir gebeye bilgi verilip imzalı Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu alındı (EK-3). Doğum sırasında steril şartlarda sağlıklı gebeden alınıp -40 C de muhafaza edilen insan AS oda sıcaklığına getirildikten sonra beslenmelerde kullanıldı. Çalışmamızda kullandığımız AS'nın osmolaritesi, $(2 \times \text{Na} + \text{Glukoz} / 18 + \text{BUN} / 2.8)$ denklemine göre hesaplandı.

Her beslenmeden önce ve sonra yavruların genel durumları, aktiviteleri, renkleri, batın gerginliği takip edilerek not tutuldu. Günlük vücut ağırlıkları kaydedildi. Bu süre içinde batında ciddi distansiyon, uyuşukluk ve respiratuar distress, sepsis bulguları gelişen hayvanlar sakrifiye edildi.

Çalışmanın 96. saatinde yaşayan denekler de 4 dakikalık ketamin sedasyonu sonrası sabitlenerek sakrifiye edildi. Hemen sonrasında, yavruların batınları penset ile gerdirildi ve 15 numara bistürü ile açıldı. Fasya ve katların ayrılmasından sonra batına girilerek mideden anüse kadar olan bağırsaklar yumuşak uçlu penset ile ezilmeden ve travmatize edilmeden çıkartıldı. Çıkartılan bağırsak kısımları renk değişikliği, ödem, stenoza ve nekroz gelişimi açısından gözle değerlendirilip not alındıktan sonra histopatolojik olarak değerlendirme için 10 cc formaldehit konulmuş 50 cc lik kapaklı kaplar içine yerleştirilerek kapaklar kapatıldı. Her örnek kabının üzerine patoloğun

bilmemesi için numaralar yazıldı, +4 derecedeki buz kaplarının arasında muhafaza edilerek patoloji bölümüne aynı gün içinde nakli sağlandı. Bağırsak kısımları %10 formalin içinde tespit edildikten sonra parafin içine gömülerek kesitler hazırlandı. Histolojik preparatlar Hematoksilen Eosin ile boyanarak hazırlandı. Mikroskopik hasar derecesine göre Musmeche ve ark. (174) sıçanlarda deneysel NEK modelinde tanımladığı skorlama kullanılarak 0-4 arası evreleme yapıldı (**Tablo 3.3**).

Tablo 3.3 Histopatolojik evreleme (174)

- **0=Histopatolojik değişiklik yok**
- **1=Kısmi mukozal nekroz**
- **2=Tam kat mukozal nekroz**
- **3=Kısmi muskularis nekrozu**
- **4=Tüm bağırsak duvarında nekroz**

Bağırsakların alınmasından sonra geriye kalan vücutlar buharlaşma ve diğer çevresel etkenlerden korunması için alüminyum folyolara sarılarak numaralandırıldı. -45°C dondurucuda muhafaza edildi. Deneklerin oldukça küçük olmaları sebebiyle tetkikler için yeterli serum örneği almak mümkün değildi. Bundan dolayı doku homojenatları üzerinde çalışıldı. Dondurulmuş doku örnekleri 0.6 g olacak şekilde tartıldı ve içerisine buz soğukluğundaki fosfat tamponu (pH 7.4) kullanılarak (1:10, ağırlık:hacim) Art-Micra® D8 doku homojenatörü kullanılarak buz içerisinde homojenize edildi. Homojenatlar 15000 rpm'de 40 dakika santrifüj edilerek katı partiküller çöktürüldü. Alınan süpernatant kısmı biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere ayrıştırıldı. Deneklerin çıkarılan karaciğer ve bağırsaklarından CRP, oksidatif stres markerları ile TNF- α , IL-8, VEGF, GM-CSF, Endotelin-1 düzeyleri incelendi.

MDA düzeyi Ohkawa ve ark. (175) tarafından kullanılan yöntem uygulandı. Buna göre; 50 μ l sodyum dodesil sülfat (SDS, %8.1)'a 100 μ l doku homojenatı eklenip, vortekslenip oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. 375 μ l asetik asit (pH 3.5, 20%) ve 375 μ l thiobarbitürik asit (0.6%) eklendi ve kaynar su banyosunda 60 dakika

bekletildi. Örnekler oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. 1.25 ml bütanol:piridin (15:1) eklenip, vortekslendi ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. 750 µl organik pembe tabaka 532 nm'de ölçüldü. Tiyobarbitürik asit ile MDA reaksiyonundan sonra reaksiyon ürünü 532 nm'de spektrofotometrik olarak takip edildi. Sonuçlar plazma için nmol/ml, doku için ise nmol/g olarak tanımlandı.

Glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitesi tayin yönteminde, H₂O₂ varlığında indirgenmiş glutasyonun (GSH) GPx tarafından okside glutatyona (GSSG) oksitlenmesi ve oksitlenen GSSG'nin glutasyon redüktaz enzimi aracılığıyla tekrar GSH'a dönüştürülmesi esnasında ortamda bulunan indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) kullanılır. Kullanılan bu NADPH miktarı absorbandsdaki azalış şeklinde 340 nm dalga boyunda izlendi. GPx aktivitesi doku için U/g protein olarak ifade edildi (176).

Katalaz (CAT) aktivitesi ekstrede Beutler yöntemi kullanılarak saptandı (177). Reaksiyon karışımı 1 M Tris-HCl pH 8.0 tampon, 10 mM hidrojen peroksit, belirli miktarda saf su ve enzim içeren ekstreden oluşmaktadır. Tepkime, 37 °C'de enzim tarafından yıkılan hidrojen peroksit'in 230 nm dalga boyunda ışık yolu 1 cm olan kuvars küvetlerde 10 dakika süreyle her 5 dakikadaki absorbands değişimi izlenerek gerçekleştirildi.

SOD aktivitesi Fridovich yöntemiyle saptandı (178). SOD aktivite tayini için ekstre 1:65 oranında 0.01 M Fosfat tampon pH 7.0 ile dilüe edildi, bu dilüsyonda aktivite tayini yapıldı. Reaksiyon karışımı ekstre, ksantin ve INT (p-iyodonitrotetrazolium viyole) içeren mikst substrat ve ksantin oksidazdan oluşur. Kör de tıpkı numune gibi hazırlanır fakat örnek yerine fosfat tamponu konmuştur. Tepkime, 37 °C'de ışık yolu 1 cm olan kuvars küvetlerde numunenin 505 nm dalga boyunda havaya karşı ilk 30 saniyedeki başlangıç absorbandsları (A1) okunarak gerçekleştirildi. Aynı anda kronometre çalıştırılarak 3 dakika sonra son absorbandsları (A2) okunmuş ve değerler standart eğriden değerlendirildi.

Rat endotelin-1 analizi için CUSABIO® Rat Endothelin 1 (ET-1) ELISA kit kullanıldı. Standart solüsyonlar S-0 dan S-6 ya kadar dilüe edilerek hazırlandı. Ardından standartlar ve örnekler Assay Plate mikro kuyucuklarına yerleştirildi. İki saat

inkübasyondan sonra kuyucuklar boşaltıldı. 100 µl biotin konjugat eklendi, 1 saat beklendi. Sonrasında yıkama solusyonu ile yıkandı. 100 µl avidin konjugat eklendi, 1 saat beklendi. Yıkama solusyonu ile tekrar yıkandı. Substrat eklendikten sonra 20 dakika ışıktan korunarak beklendi. Stop solusyon ile reaksiyon durduruldu ve takip eden 5 dakika içinde Thermo Multiskan FC® cihazı ile 450 nm de spektrofotometrik ölçümler yapıldı.

Rat IL-8 analizi için CUSABIO® Rat Interleukin 8 (IL8/CXCL8) ELISA kit kullanıldı. Standart solüsyonlar S-0 dan S-6 ya kadar dilüe edilerek hazırlandı. Ardından standartlar ve örnekler Assay Plate mikro kuyucuklarına yerleştirildi. İki saat inkübasyondan sonra kuyucuklar boşaltıldı. 100 µl biotin konjugat eklendi, 1 saat beklendi. Sonrasında yıkama solusyonu ile yıkandı. 100 µl avidin konjugat eklendi, 1 saat beklendi. Yıkama solusyonu ile tekrar yıkandı. Substrat eklendikten sonra 20 dakika ışıktan korunarak beklendi. Stop solusyon ile reaksiyon durduruldu ve takip eden 5 dakika içinde Thermo Multiskan FC® cihazı ile 450 nm de spektrofotometrik ölçümler yapıldı.

Rat GM-CSF analizi için eBioscience® Rat GM-CSF Platinum ELISA kit kullanıldı. Standart solusyonlar ve örnekler hazırlandıktan sonra takip eden 5 dakika içinde Thermo Multiskan FC® cihazı ile 450 nm de spektrofotometrik ölçümler yapıldı.

Rat TNF- α analizi için eBioscience® Rat TNF- α Platinum ELISA kit kullanıldı. Standart solusyonlar ve örnekler hazırlandıktan sonra takip eden 5 dakika içinde Thermo Multiskan FC® cihazı ile 450 nm de spektrofotometrik ölçümler yapıldı.

Rat VEGF analizi için RayBio® Rat VEGF ELISA Kit kullanıldı. Standart solusyonlar ve örnekler hazırlandıktan sonra takip eden 5 dakika içinde Thermo Multiskan FC® cihazı ile 450 nm de spektrofotometrik ölçümler yapıldı.

Rat C-Reaktif Protein analizi için BioVendor® Rat CRP kiti kullanıldı. Standart solusyonlar ve örnekler hazırlandıktan sonra takip eden 5 dakika içinde Thermo Multiskan FC® cihazı ile 450 nm de spektrofotometrik ölçümler yapıldı.

İstatistiksel analiz:

İstatistiksel analiz için Statistical Package for Social Science (SPSS) for Windows 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanıldı. Gruplara ait değerler Ortalama \pm Standard Deviasyon (SD), Median (Range), oranlar ve yüzdeler şeklinde verildi. Varyans analizi (ANOVA) ile gruplar arası farklılıklar araştırıldı. Post hoc Tukey HSD ile gruplar arası farklılıklar ortaya konuldu ($p < 0,05$). Bağımsız örneklerin değerlendirilmesi Student T-testi ile yapıldı. Gruplar için TNF- α , IL-8, ET-1, VEGF, GM-CSF, MDA, SOD, CAT, GPx kendi aralarında ve diğer değişkenlerle ilişkiler için Pearson korelasyon testi kullanıldı. Ki-kare testi ile farklılıklar saptanmaya çalışıldı. Test sonucu $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı değerlendirildi.

4.BULGULAR

Çalışmada Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Deneysel Hayvan Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilen 47 yenidoğan sıçan kullanıldı. Deneklerin doğum tartıları ve takip edildikleri süre boyunca vücut ağırlıkları günlük olarak takip edildi. Deneklerin doğum ağırlıkları, günlük ağırlık takipleri, yaşam süreleri ve intestinal perforasyon varlığı ile ilgili veriler **Tablo 4.1** de görülmektedir.

Toplamda tek anneden doğan G₁'de 7, G₂'de 9, G₃'de 11, G₄'de 10 ve G₅'de 10 sıçan yavrusu izlendi. G₁ anne sütü ile beslendi, kontrol grubu olarak ayrıldı. Diğer gruplar ise günde 2 defa daha önce tarif edilen şekilde hipoksi ve hipotermiye maruz bırakıldı. G₃ insan AS ile, G₄ formula mama ile, G₅ ise insan AS ile hazırlanan formula mama ile belirtilen yöntemle beslendi.

Tablo 4.1 Gruplara göre deneklerin ortalama vücut ağırlıkları, yaşam süreleri ve intestinal perforasyon sıklıkları

Grup	Vücut Ağırlıkları (gram)					Yaşam süresi (saat)	İntestinal Perforasyon %
	Doğum	24. s	48. s	72. s	96. s		
G ₁ (n:7)	5.64±0.55	6.53±0.59	7.24±0.59	8.06±0.57	8.89±0.57	96±0	%0
G ₂ (n:9)	5.57±0.41	5.96±0.34	6.46±0.37	6.90±0.32	7.54±0.41	96±0	%0
G ₃ (n:11)	5.53±0.29	5.80±0.27	5.50±0.28	.	.	41.5±6.22	%36.4
G ₄ (n:10)	5.69±0.27	5.97±0.25	5.98±0.19	.	.	45.2±6.39	%60
G ₅ (n:10)	5.79±0.29	6.11±0.39	6.27±0.47	.	.	51.3±10.47	%30

Toplamda tek anneden alınan 25 ml insan AS G₃ ve G₅ gruplarının beslenmelerinde kullanıldı. Kullanılan AS'nın biyokimyasal incelemeleri ve hücre sayımı **Tablo 4.2** de belirtilmiştir.

Tablo 4.2 Beslenmelerde kullanılan amnion sıvısına ait biyokimyasal tetkikleri ve hücre sayımı

Amnion sıvısına ait biyokimyasal tetkikler ve hücre sayımı	
Glukoz	21 mg/dL
Sodyum	124 mEq/L
Potasyum	4 mEq/L
Klor	104 mEq/L
Kalsiyum	8.7 mg/dL
Fosfor	3.8 mg/dL
BUN	9 mg/dL
Total Protein	0.7 g/dL
Albumin	0.6 g/dL
Osmolarite	252.3 mosm/L
Lökosit	0.97 K/uL
Nötrofil	0.21 K/uL
Lenfosit	0.49 K/uL
Eritrosit	0.03 M/uL
Hemoglobin	0 g/dL
Trombosit	52000 K/uL
C-Reaktif Protein	3.3 mg/L

Ayrıca G₄ ve G₅ yavrularının beslenmelerinde kullanılan Bebelac® 1 numaralı bebek mamasının özellikleri **Tablo 4.3** de gösterilmektedir.

Tablo 4.3 Beslenmelerde kullanılan formula mamanın içerik bilgileri (Bilgiler ürünün paketi üzerindeki tablodan alınmıştır.)

Besin Değerleri (100 ml)	
Enerji	65 kcal
Yağ	3,4 gr
Karbonhidratlar	7,4 gr
Prebiyotik lifler	0,8 gr
Protein	1,3 gr
A Vitamini	54 mcg
D3 Vitamini	1,2 mcg
E Vitamini	1,1 mg
K1 Vitamini	4,4 mcg
B1 Vitamini	50 mcg
B2 Vitamini	116 mcg
B3 Vitamini	0,43 mcg
Pantetonik Asit	330 mcg
Pridoksin	40 mcg
Folik Asit	13 mcg
B12 Vitamini	0,18 mcg
Biotin	1,5 mcg
C Vitamini	9,2 mg
Sodyum	17 mg
Potasyum	65 mg
Klorür	42 mg
Kalsiyum	47 mg
Fosfor	26 mg
Magnezyum	5,1 mg
Demir	0,53 mg
Çinko	0,5 mg
Bakır	50 mcg
Manganez	7,5 mcg
Florür	≤ 3 mcg
Selenyum	1,5 mcg
İyot	12 mcg
L-Karnitin	1,1 mg
Kolin	10 mg
İnozitol	3,4 mg
Taurin	5,3 mg
Nükleotidler	3,2 mg



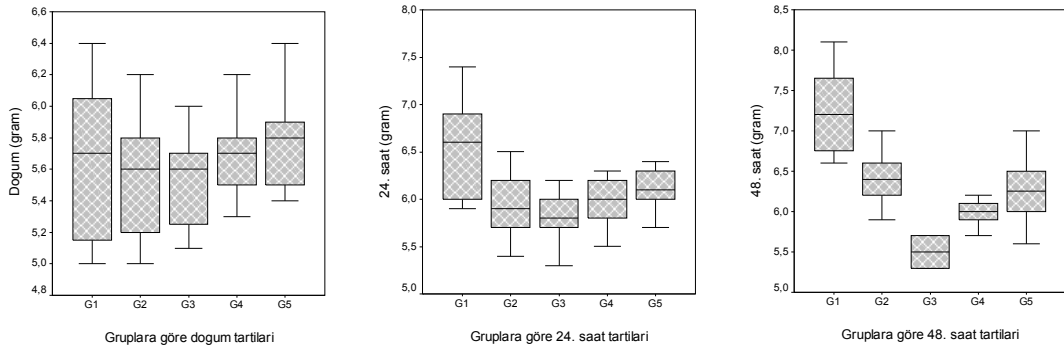
Şekil 4.1 Solda formula mama ile beslenen, sağda anne sütü ile beslenen ikişer yavru görülmektedir. Soldakilerin karın çevrelerinin artmış olduğu, karın cilt renklerinin koyulaşmış olduğu ve daha hipoaktif olan yavruların genel durumlarının daha kötü olduğu dikkat çekmektedir.



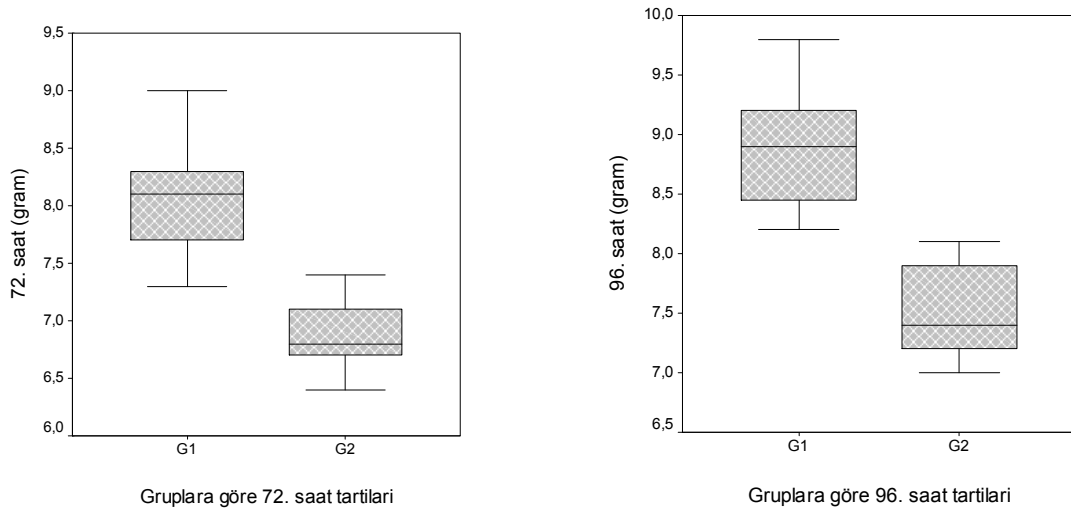
Şekil 4.2 AS ile hazırlanmış formula mama ile beslenen bir yavrunun 32. saatte çekilmiş fotoğrafı görülmektedir. Hipotonik olan yavrunun artmış batın çevresi ve koyulaşmış cilt rengi dikkat çekmektedir.

Grupların ortalama doğum ağırlıkları değerlendirildiğinde gruplar arasında farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Fakat beslenme gruplarına göre değerlendirildiğinde ise ilk 24. saatin sonunda G_1 grubunun G_2 ($p:0.027$), G_3 ($p:0.002$) ve G_4 ($p:0.027$) gruplarından daha fazla kilo aldığı saptandı. Fakat G_1 ve G_5 gruplarının ilk 24. saatte ağırlık artışları arasında anlamlı fark bulunmadı ($p:0.159$).

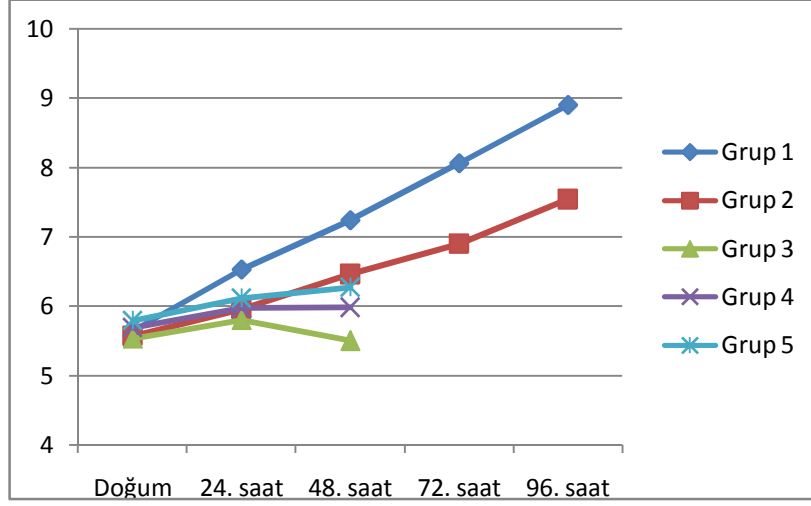
Grupların 48. saat ağırlık değerlendirilmesinde ise çalışma gruplarındaki deneklerin sayısının azalması nedeniyle karşılaştırma yapılamadı.



Grafik 4.1a, 4.1b ve 4.1c. Sırasıyla doğumda, birinci ve ikinci gün sonlarında gruplara göre deneklerin ağırlıkları kıyaslanmaktadır.



Grafik 4.2a ve 4.2b. Üçüncü ve dördüncü gün sonlarında G_1 ve G_2 deneklerinin ağırlıkları kıyaslanmaktadır.



Grafik 4.3. Günlere göre grupların ortalama tartı takipleri (gram)

Hayatta kalan G_1 ve G_2 deneklerinin ağırlık artışları kıyaslandığında G_1 sıçanlarının 72. saat ($p:0.001$) ile 96. saatlerde ($p:0.001$) G_2 'den daha fazla kilo aldıkları saptandı.

Doğumdan sonraki 24 saat içindeki tartı alımları incelenen deneklerin yükselmiş IL-8 ($p:0.001$) ve TNF- α ($p:0.005$) düzeyleri ile ilk günkü tartı alımlarının az olmasıyla ilişkili saptandı. Ayrıca VEGF düzeyinin yükselmesiyle deneklerin ilk günde aldıkları tartının daha fazla olduğu tespit edildi ($p:0.005$).

İkinci günün sonunda bakılan tartı alımları değerlendirildiğinde ise TNF- α ($p:0.003$) ile IL-8 ($p:0.0001$) negatif ilişki, VEGF ($p:0.025$) ile de pozitif ilişki saptandı.

Deneklerin izlemi süresince hiçbir yavru sıçanda enfeksiyon bulgusu gözlemlenmedi ve bunun değerlendirilmesinde CRP değerinin gruplar arasında farklılığa neden olmadığı tespit edildi ($p>0.05$).

Batının explorasyonunda G_3 ' yavrularının 4'ünde (%36.4), G_4 'ün 6'sında (%60) ve G_5 'deki yavruların ise 3'ünde (%30) intestinal perforasyon geliştiği saptandı (**Tablo4.1**). İntestinal perforasyonu olan yavrularda batın içinde serbest gaita ve koyu kanlı sıvı görünümü mevcuttu. Bu perforasyon görünümü G_1 ve G_2 yavrularında gözlemlenmedi.

İntestinal perforasyonları olan yavruların yaşam sürelerinin daha kısa olduğu tespit edildi (p:0.001). İntestinal perforasyon gelişen vakaların %11.8'inde evre 1, %76.9'unda evre 2, %7.7'sinde ise evre 3 doku hasarı bulguları mevcuttu. Evre 2 ve 3 olarak değerlendirilen patolojik örneklerin tamamında intestinal perforasyon saptandı. İntestinal perforasyonu olan yavruların bağırsaklarının patolojik incelemesinde NEK bulgularının ve mukozal hasarın daha ciddi olduğu tespit edildi (p:0.0001). Patolojik değerlendirmeleri evre 1 ve evre 2 olan deneklerin enflamatuar ve oksidan parametreleri arasında anlamlı ilişki bulunmadı (p>0.05). Her ne kadar perforasyonu olan deneklerde oksidan-antioksidan sistemler arasında anlamlı ilişki bulunamasa da, ET-1 seviyelerinin bu grupta daha düşük olduğu saptandı (p:0.007) (T-Test).

Gastrointestinal sistemlerin patolojideki makroskopik incelenmesinde kontrol grubunda bulunan yavruların bağırsakları pembe renkli, kesintisiz ve normal görünümdeydi. Anne sütü ile beslenen deneklerin de çıkarılan bağırsaklarının makroskopik görünüşleri benzer özelliklere sahipti (**Şekil 4.3**). G₃ olgularının % 27.3'ünde de patolojik değişiklik saptanmadı ancak G₃'ün geri kalan kısmında, G₄ ve G₅ yavrularının ise tamamında çeşitli evrelerde NEK'e ait değişiklikler saptandı (**Tablo 4.4**).

Gruplar maruz kaldıkları stres yönünden değerlendirildiğinde oksidatif stresin en önemli göstergelerinden birisi olan malondialdehit (MDA) düzeylerinin gruplar arasında farklı olmadığı saptandı (p>0.05).

Ayrıca antioksidan olarak bakılan GPx, SOD seviyelerinde de farklılık saptanmadı (p>0.05). Ancak CAT'ın enzim seviyeleri incelendiğinde ise G₃'teki yavrularda G₄'ten daha yüksek olduğu saptandı (p:0.027). Oksidan ve antioksidan sistem arasındaki ilişki incelendiğinde ise G₁'de GPx ile MDA seviyelerinin arasında ters ilişki tespit edilirken (p:0.023), G₃'te ise MDA ve CAT düzeyleri arasında pozitif ilişki gözlemlendi (p:0.042).

İnflamasyonun göstergeleri olan TNF- α , IL-8 seviyeleri incelendi. TNF- α seviyeleri yönünden gruplar arasında anlamlı farklılık gösterilemedi (p>0.05). Ancak IL-8 seviyeleri G₂ dışındaki diğer gruplarla kıyaslandığında G₁'de belirgin olarak düşüktü (p:0.001). Ayrıca G₂'de de G₃ (p:0.001), G₄ (p:0.024) ve G₅'teki yavrulardan

(p:0.042) daha düşük olduğu saptandı. G₃ olguları ile G₅ olgularına AS verildiğinden dolayı yapılan incelemede bu iki grup arasındaki değerlendirilmede G₃ olgularında GM-CSF düzeyinin G₅'ten daha düşük olduğu (p:0.020) saptandı. Ancak her iki grup arasında ET-1, MDA, SOD, CAT, GPx, TNF- α , IL-8 düzeyleri ile VEGF yönünden anlamlı farklılık saptanmadı. G₃ olgularında CAT (p:0.030) ve GPx'in (p:0.039) G₄'den daha düşük olduğu saptandı. Ayrıca, G₄'de G₅'e göre GM-CSF (p:0.059) ve MDA (p:0.082) düzeylerinin anlamlılığa yakın daha yüksek olduğu tespit edildi.

AS verilenler ile verilmeyen denekler kıyaslandığında oksidatif ve antioksidatif bulgular ile enflamasyon bulguları arasında farklılık saptanmadı (p>0.05). Fakat AS verilenlerde ET-1 seviyelerinin diğer gruplardan daha düşük olduğu (p:0.016) tespit edildi.

Tüm deneklerin sonuçlarına göre yapılan analizde IL-8 ve TNF- α arasında pozitif korelasyon saptandı (p:0.007). Bunlarla birlikte IL-8 seviyeleri yüksek olması ile birinci (p:0.013) ve ikinci (p:0.001) günlerde deneklerin daha az tartı almaları arasında anlamlı ilişkili bulundu. Diğer enflamasyon göstergesi olan GM-CSF seviyelerinde de gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edilemedi (p>0.05).

Vasküler hasarın göstergeleri olan ET-1 ve VEGF düzeylerinde gruplar arasında farklılık izlenmedi (p>0.05). Fakat tüm deneklerin VEGF sonuçları ayrıca incelendiğinde, enflamatuar sitokinlerden olan IL-8 (p:0.002) ve TNF- α 'nın (p:0.023) yükselmesi ile VEGF düzeyinde anlamlı düşüş olduğu saptandı.



Şekil 4.3 Anne sütü ile beslenen yavrunun çıkarılan bağırsağı



Şekil 4.4 Formula mama ile beslenen yavrunun çıkarılan bağırsağı. Koyu renkli, kalınlaşmış, ödemli ve olası nekroze bölgeler görülmektedir.

Denek bağırsaklarının histopatolojik örnekleri Musemeche ve ark. (174) tanımladığı yöntem ile evrelendi. Buna göre grupların histopatolojik evrelemesi **Tablo 4.4**'de görülmektedir.

Tablo 4.4 Gruplara göre NEK'in patolojik evrelemesi

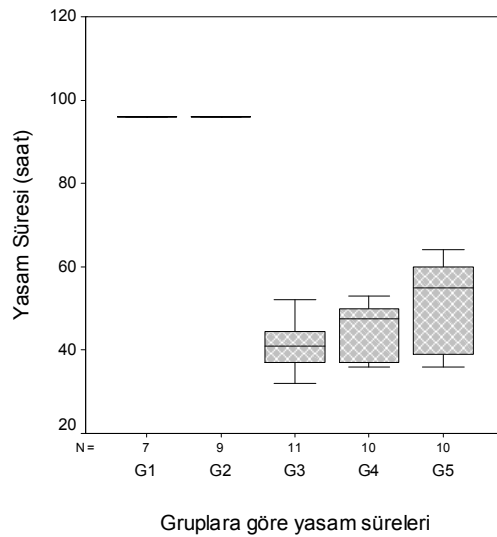
Grup	Evre 0	Evre 1	Evre 2	Evre 3
G ₁ (n:7)	7 (%100)	0	0	0
G ₂ (n:9)	9 (%100)	0	0	0
G ₃ (n:11)	3 (%27.3)	5 (%45.5)	3 (%27.3)	0
G ₄ (n:10)	0	4 (%40)	5 (%50)	1 (%10)
G ₅ (n:10)	0	8 (%80)	2 (%20)	0

Perforasyon için risk faktörleri değerlendirildiğinde perfore olanlarda oksidan ve antioksidan ajanlarla ilişki saptanmadı. Ayrıca enflamasyon göstergeleri ile de ilişki tespit edilemedi. Ancak ET-1 düzeyleri ile anlamlı bir farklılık saptandı (p:0.007).

Deneklerin yaşam süreleri kıyaslandığında G₁ ve G₂ olguları 96. saat sonunda ketamin altında sakrifiye edildi. Fakat G₃ yavrularının ortalama yaşam süresi 41,5±6,22 saat iken, bu süre G₄'te 45,2±6,40 ve G₅'te ise 51,3±10,47 saat olarak hesaplandı (Tablo 4.1). G₃ ile G₄ ve G₄ ile G₅ grupları arasında yaşam süreleri açısından anlamlı fark bulunmazken; G₃ grubunun ortalama yaşam süresinin G₅'den daha kısa olduğu saptandı (p:0.009). Yaşam sürelerine etkileyen faktörler incelendiğinde VEGF (p:0.001) ve ET-1 (p:0.003) düzeyleri ile yaşam süreleri arasında pozitif korelasyon tespit edildi. Artan IL-

8 düzeyleri ile yaşam süresinin anlamlı olarak azaldığı saptandı (p:0.001). NEK evresi arttıkça (p:0.001) ve intestinal perforasyon varlığı (p:0.001) ile de deneklerin yaşam sürelerinin anlamlı olarak azaldığı saptandı. Bunlardan başka, birinci (p:0.045) ve ikinci (p:0.001) günde tartı alımı ile yaşam süreleri arasında pozitif korelasyon tespit edildi.

G₃'te CAT'ın yükselmesi ile deneklerin yaşam sürelerinin azalması arasında negatif ilişki saptandı (p:0.033). Ayrıca G₂'de SOD ve TNF- α arasında (p:0.045), G₅'te de SOD ve GPx düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptandı (p:0.033). GPx, G₁'de CRP ile pozitif korele iken (p:0.023), G₂ (p:0.006), G₄ (p:0.022) ve G₅'te (p:0.011) GPx ile CRP arasında negatif korelasyon mevcuttu. TNF- α ve deneklerin yaşam süreleri arasında korelasyon incelendiğinde, G₂ (p:0.032) ve G₅'te (p:0.001) pozitif yönde anlamlı ilişki saptandı. G₃'te TNF- α ve ET-1 arasında pozitif korelasyon (p:0.003), G₄'te ise TNF- α ve CRP düzeyleri arasında negatif korelasyon mevcuttu (p:0.008)



Grafik 4.4 Grupların ortalama yaşam süreleri görülmektedir.

Enflamasyonun iyi bir göstergesi olan IL-8 seviyeleri G₁'de G₂ dışında tüm diğer gruplardan anlamlı olarak daha düşük saptandı (p:0.001). G₂'de de G₃ (p:0.001), G₄ (p:0.024) ve G₅'in (p:0.042) IL-8 düzeylerine göre anlamlı olarak düşüklük saptandı. G₁ ve G₂ arasında ise IL-8 seviyeleri arasında anlamlı farklılık bulunmadı (p:0.640). G₃'te IL-8 ve ET-1 düzeyleri arasında pozitif korelasyon (p:0.016), G₄'te ise IL-8 ve VEGF düzeyleri arasında negatif korelasyon mevcuttu (p:0.034).

GM-CSF seviyelerinde gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). G_1 'de GM-CSF düzeyleri ile VEGF düzeyleri arasında pozitif korelasyon ($p:0.005$), GM-CSF ve ET-1 arasında ise negatif korelasyon ($p:0.023$) saptandı. G_3 'te ise, GM-CSF ile TNF- α ($p:0.029$) ve ET-1 ($p:0.021$) düzeyleri arasında pozitif korelasyon mevcuttu.

Vasküler Endotelyal Growth Faktör (VEGF) ve Endotelin-1 (ET-1) düzeylerinde gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$)

Tablo 4.5 Gruplara göre enflamatuar ve oksidan-antioksidan parametrelerin ortalama değerleri

Grup	CRP (ng/ml)	TNF- α (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	ET-1 (pg/ml)	GM-CSF (pg/ml)	MDA (nmol/mg)	SOD (ü/mgprt)	CAT (ü/mgprt)	GPx (ü/mgprt)
G ₁	92.83	47.74	4.05*	59.17§£	73.4¥£	53.53	28.96	12.96	131.11	12.78*
G ₂	81.79	59.02	8.46	57.53 λ β	67.02 β	43.44	25.69	18.19	158.94	6.85
G ₃	91.8	72.12¥	23.1¥, γ	52.49	59.74	43.98	26.21	17.72	231.7¥ δ	9.49
G ₄	101.36	73.98	17.62§ λ	46.98	60.55	52.18	31.54 λ	19.81	116	13.5 λ δ
G ₅	82.54	106.9	16.96£ β	47.05	56.84	79.45 β	29.77	14.28	155.38	11.82 β

*G₁ ile G₂ arasında ¥; G₁ ile G₃ arasında §; G₁ ile G₄ arasında £; G₁ ile G₅ arasında γ ; G₂ ile G₃ arasında

λ ; G₂ ile G₄ arasında β ; G₂ ile G₅ arasında δ ; G₃ ile G₄ arasında θ ; G₃ ile G₅ arasında $p < 0.05$,

5. TARTIŞMA

Yenidoğan ünitelerinde takip edilen özellikle prematüre bebeklerin gastrointestinal hastalıklarından en önemlilerinden olan nekrotizan enterokolit, etyolojisi tam aydınlatılmamış ve mortalitesi yüksek bir hastalık olarak bilinmektedir (179). NEK, kliniği hızla kötüleştirerek tüm doku sistemlerini etkileyerek organ yetmezliklerine ve ölüme sebep olabilmektedir (180). Patogenezi tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen hastalığın etiyolojisinde prematürite ile birlikte, hipoksi, nutrisyonel destek şekli, bakteriyel enfeksiyon, intestinal iskemi ve gastrointestinal distansiyon ile birlikte yapısal malformasyon gibi risk faktörleri suçlanmaktadır (181).

Daha önce yapılan çeşitli klinik araştırmalarda ve deneysel NEK modeli hayvan çalışmalarında probiyotikler, immunglobulinler, antibiyotikler, esansiyel aminoasitler, laktoferrin ve değişik beslenme rejimlerinin hastalığın gelişimi ve gidişatı üzerindeki etkileri incelenmiştir (153,156,160,163,165,169,172,173). Fakat AS'nın direkt verilmesi veya beslenme içeriğine eklenmesi ile yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Biz de bu çalışmada AS'nın NEK'teki koruyucu ve tedavi edici rolünü incelemeye çalıştık. Çünkü risk faktörleri (düşük O₂ saturasyonu, düşük tansiyon, nutrisyonel destek, travmalar, siyanotik hastalıklar, hidrops fetalis vb.) olsa bile, fetüsün anne karnında olduğu dönemde NEK'in ortaya çıkmaması nedeniyle anne karnında fetüsün yuttuğu AS'nın bağırsakların maturasyonu ve korunmasında faydalı olabileceğini düşüncesi ile bu çalışma yapıldı. Daha önce literatürde NEK'in koruyucu olabileceğine dair düşünceler bildirilmiştir (4). Ancak direkt AS verilerek yapılan bir çalışmaya Türkçe ve İngilizce yapılmış olan literatürde rastlanmamıştır. Bu çalışmamızda da deneysel modelle NEK oluşturularak dolaylı olarak AS'nın rolü incelenmeye çalışılmıştır. NEK için birçok hayvan modeli kullanılmıştır, bunlar genellikle yenidoğan sıçan, tavşan ve domuz yavruları olmuştur (182). Her ne kadar NEK özellikle immatur ve prematur bebeklerde görülse de biz de bu çalışmada bizim sonuçlarımızı çok etkilememeyeceğini düşünerek *Sprague Dawley cinsi* miadında ve normal yolla yeni doğmuş sıçan yavrularını kullandık. Çünkü prematür yavru elde etmek için kullanılacak ilaçların bağırsak perfüzyonu üzerindeki etkilerinin ayırt edilemeyeceği kanısıyla sıçanlar erken doğuma zorlanmadı.

Literatürde domuz yavrularında süperior mezenterik arter belirli sürelerle klemplenip açılarak hipoperfüzyon yöntemiyle NEK oluşturulmuştur (183). Ancak yenidoğan sıçanlarla yapılan çalışmalarda ise hipoksi ve hipotermiye maruz kalan organizmanın daha önce “dalış refleksi” olarak tanımlanan mekanizma ile beyin ve kalp perfüzyonunun korunması, buna bağlı olarak gastrointestinal sistem kan akımının azalması prensibine dayandırılmıştır (7). Buna göre ilk hipoperfüzyon-hipoksi modeli 1975’de Barlow ve ark. (184) tarafından tanımlanmıştır. Bu modelde hipoksi ve hipoterminin çeşitli aralıklarla uygulanması gerektiği bildirilmiştir. Zuckerbraun ve ark. (185) denekleri günde 3 defa belirtilen streslere maruz bırakırken, Caplan ve ark. (186) ise 1994’de yaptıkları çalışmada günde 2 defa 10 dakika +4°C hipotermi ve ardından 60 saniye süren hipoksi uygulanması ile insan yenidoğanında görülen NEK’e klinik ve patolojik olarak oldukça benzer hastalık geliştirilebileceğini ortaya koymuşlardır. Biz de Caplan ve ark (186) tanımladığı yöntemi kullandık. Deneklerin takip edilme süresi de Caplan’ın (186) çalışmasında olduğu gibi 96 saat olarak belirlendi.

Temiz ve ark. (187) ve Kumral ve ark. (188) çalışmalarında deneklere %100 karbondioksit solutarak hipoksi oluşturulurken, diğer birçok çalışmada %100 nitrojen verilmesi tercih edilmiştir (189,190). Bizim çalışmamızda da içerisindeki hava aspire edilen kavanoza %100 nitrojen verilerek hipoksik ortam sağlandı. Hipoksi döneminin ikinci yarısında deneklerin siyanoze renk değişiklikleri, gasping solunumları ve bir kısmında da gaita çıkışı gözlemlendi (**Şekil 3.3 ve 3.4**).

Yenidoğan yavruların hedeflenen hacimde düzenli olarak beslenmesi de çalışmamızın özen gösterilen noktalarından biri oldu. Domuz yavrularında yapılan deneysel NEK çalışmalarında deneklerin nasogastrik veya orogastrik sondalarla aralıklı bolus veya infüzyon ile beslendikleri bildirilmektedir (191). Yenidoğan sıçanların midelerine yerleştirmek için yeterli incelik ve yumuşaklıkta sonda marketlerde mevcut değildi. Halpern ve ark. (192) yaptıkları deneysel çalışmalarında yavruları Hoshiba’nın geliştirdiği silikon yapıda özel tasarlanmış beslenme sondaları ile beslemişlerdir (193). Biz de çalışmamızda sarı intraketlerin silikon kısımlarını kullanarak besledik (**Şekil 3.5**). Verilen hacimden emin olunması için insülin enjektörleri kullanıldı. Beslenme aralıkları ve hacmi her 4 saatte bir 0.1 ml olacak şekilde düzenlendi.

Tüm gruplara ait deneklerin doğum tartıları arasında anlamlı farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$). Birinci günün sonundaki değerlendirmede anne sütü ile beslenmiş olan G_1 yavrularının G_2 yavrularından daha fazla kilo aldıkları gözlemlendi ($p<0.05$). G_2 'nin tartı alımı 48., 72. ve 96. saatlerde G_1 'den anlamlı olarak daha düşük saptandı ($p<0.05$). Her iki grubun beslenme prosedürü aynıydı ve iki grup arasında oksidatif ve antioksidatif ajanlar, enflamasyon ve vasküler etkilenmede farklılık olmamasına rağmen ($p>0.05$) tartıdaki bu farklılık yenidoğan yavruların maruz kaldıkları hipoksi ve hipotermiye bağlanabilir. Çünkü kilo alımında en önemli ajanlardan birisi TNF- α dır (194). Bizim çalışmamızda da her iki grup arasında yapılan analizde TNF- α stres oluşturulan grupta daha yüksekti, ancak istatistiksel anlamlılık saptanmadı. Yapılan diğer NEK model çalışmalarında kilo takibi ile TNF- α arasında bir ilişki kurulamamıştı. İnsanlarda yapılan çalışmalarda da artmış TNF- α 'nın NEK ve sepsis için bir risk faktörü olduğu bilinmektedir (195). Bizim çalışmamızda da olgu sayısının küçük olması istatistiksel anlamlılığın oluşmamasında etkili olmuş olabilir. Belki de deneklerin ömrü daha uzun olsaydı daha belirgin NEK kliniği ile birlikte G_2 olgularında NEK kliniği gelişmiş ve TNF- α düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptanacaktı. Ayrıca, G_2 olgularının anne sütü ile beslenmiş olması bu vakalarda NEK bulgularının ortaya çıkmasını engellemiş olabilir. Çünkü anne sütü ve kolostrum ile beslenmenin içerdiği lizozimler, laktoferrin ve immunglobulinler nedeniyle NEK'e karşı koruyucu olduğu daha önce yapılmış birçok çalışmada ortaya konmuştur (137,154). Ayrıca, anne sütüyle beslenen çocuklarda mama ile beslenenlere kıyasla daha yüksek kan antioksidan kapasite ve daha düşük oksidatif stres yoğunluğu olduğu bildirilmiştir (196). Ancak bizim çalışmamızda G_2 olgularında SOD, CAT seviyeleri yüksek olmasına rağmen, istatistiksel anlamlılık saptanamadı ($p>0.05$). Bu durum olgu sayısının yetersizliğine, çalışılan sürenin kısalığına bağlanabilir. Ayrıca, oluşturulan stresi tamponlayan anne sütündeki antioksidan moleküllerin stresi nötralize etmesi nedeniyle yüksek bulunmamış olabilir. IL-10'un anne sütünde yüksek miktarda varlığının NEK'e karşı koruyucu olduğu ileri sürülmüştür (197). Ancak bizim çalışmamızda IL-10 düzeyine bakılmadı. NEK olşumunda suçlanan faktörlerden bir tanesi enflamasyondur (54, 65, 67,68). Enflamasyonun en önemli göstergelerinden bir tanesi IL-8 olup ciddi NEK vakalarında hastalığın başlangıcından itibaren ilk 24 saatte IL-8 seviyelerinin anlamlı ölçüde yükseldiği gösterilmiştir (198). Bell skorlaması ilerledikçe veya histopatolojik değişiklikler ağırlaştıkça IL-8 seviyelerinin de anlamlı olarak artış gösterdiği

bildirilmiştir (198). Ayrıca, akut NEK gelişmiş olup opere edilen bebeklerin bağırsaklarından alınan örneklerde; seroza, muskularis ve intestinal epitel tabakalarında IL-8'in arttığı ortaya konmuştur (199). Benzer şekilde, IL-8'in artmış transmural ve mukozal mRNA transkripti intestinal enflamasyon ve nekroz gelişimi ile ilişkili bulunmuştur (200). Benkoe ve ark. (201) nekrotizan enterokolitte bağırsak tutulumunu değerlendirmede prediktif test yöntemi olarak IL-8'i inceledikleri çalışmalarında cerrahi tedavi gerektiren 40 nekrotizan enterokolitli yenidoğanın ameliyat öncesi IL-8 seviyeleri ile tutulum derecesi arasında korelasyon olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda da stres oluşturulan gruplarda IL-8 seviyeleri kontrol grubunun 2 katı olmasına rağmen gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edilemedi ($p>0.05$). Bu durum denek sayısı, deneklerin takip süresi ve anne sütünün koruyucu etkilerine bağlanabilir (137, 154, 196, 202).

Bunların dışında NEK oluşumunda suçlanan faktörlerden biri de doku perfüzyonunun bozulmasıdır. Biz uyguladığımız stres ile bunu gerçekleştirmeye çalışmış olsak da anne sütü ile beslenme bu bozukluğun ortaya çıkmasını engellemiş olabilir. Aynı nem oranı ve ortam sıcaklığı şartlarında takip edilmiş olmalarına rağmen annelerinin yanında kalan yavruların ısısının anne tarafından düzenlenmesi de anlamlı değişken olabilir. Perfüzyonun, neovaskulogenezisin en önemli göstergeleri GM-CSF, ET-1 ve VEGF'dür. VEGF angiogenezi uyaran bir sinyal proteini olup, doku oksijeninin yetersiz kaldığında kan dolaşımını geri döndürmeye çalışan sistemin bir elemanı olarak tanımlanmıştır. Embriyonik gelişim aşamalarında, cerrahi veya yaralanma sonrası yeni damar oluşumunda, egzersiz sonrası kas dokusunda ve tıkanan damarların yerine kollateral dolaşımın sağlanmasında etkileri gösterilmiştir (203). Buna göre VEGF'nin azalması ile kollateral dolaşım, yeni damarların oluşumu ve onarılması gerçekleşmemekte; sonuçta doku nekrozu ilerleyebilmektedir. VEGF'nin ayrıca, apoptosisi, buna bağlı olarak doku hasarını da engellemede etkili olduğu ileri sürülmüştür (114). Mezenkimal kök hücreleriyle yapılan deneysel çalışmalarda hipoksik doku hasarı sonrası remodeling sürecinde VEGF'nin de etkili olduğu gösterilmiştir (114). Erken emzirme döneminde anne sütünde daha fazla miktarda bulunduğu gösterilen VEGF'nin (204-206) intestinal alanda perfüzyonu düzenleyerek NEK gelişimini engelleyebileceği ileri sürülmektedir. Bizim çalışmamızda da VEGF seviyesinin çok anlamlı farklılık olmasa da, stres oluşturulan grupta kontrol grubuna

göre düşük olduğu görüldü ($p>0.05$). Bu durum olgu sayısının yetersizliğine, anne sütü ile geçen antioksidan ajanların etkisine, NEK kliniğinin gelişmemesine, anne sütünden geçen koruyucu ajanların perfüzyonu düzenlemesine bağlanabilir. Ayrıca, oluşturulan hipoksi-hipoperfüzyon modelinin yetersiz kalması ile açıklanabilir.

ET-1 damar cidarındaki kan akımının düzenlenmesinde rol oynayan önemli faktörlerden birisi olarak kabul edilmektedir. Perfüzyonun bozulduğu durumlarda çeşitli uyarıların etkisiyle arttığı, kan basıncını yükselttiği, organ fonksiyonlarının bozulmasında veya korunmasında rol oynadığı bilinmektedir (207,208). Daha önce yapılan çalışmalarda hipoksi ve hipotermi ile artan ET-1'in, mikrovasküler disfonksiyon ve nekroza gidişte rol oynadığı ileri sürülmüştür (209). NEK kliniği olan bebekler üzerinde yapılan patolojik incelemede rezeke edilen intestinal segmentlerde histolojik olarak nekroze olan bölümlerde ET-1 seviyelerinin arttığı gösterilmiştir. Bununla beraber etkilenen bölgelerdeki arteriollerde, sağlam dokudaki arterioller ile karşılaştırıldığında artmış vazokonstriksiyon ortaya konulmuştur (210). Bizim çalışmamızda da, G₁ ve G₂ yavruları arasında yapılan kıyaslamada ET-1 seviyesinin strese maruz kalanlarda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha düşük olduğu tespit edildi ($p>0.05$). Bu düşüklük vasküler hasarın ciddi olmamasına bağlanabilir. Çünkü bu grupta yapılan batının eksploratif incelenmesinde perforasyonun saptanmaması, patolojik incelemede NEK'e ait değişikliklerin olmaması gösterge olarak kullanılabilir. Ayrıca, oluşturulan stresin uzun sürmemesi, mekanik obstruktif vasküler lezyonun olmaması, böbrek, beyin ve kardiyak dokuların ciddi hasarlanmaması katkıda bulunmuş olabilir. Bunların dışında, anne sütünde bulunan koruyucu maddelerin perfüzyonun devamını sağlamada rol oynaması ET-1 seviyesinin yükselmesini engellemiş olabilir. Bizim çalışmamızda da, G₂ vakalarının CAT değerlerinin G₁ vakalarından anlamlı olmasa da daha yüksek olduğu, G₂ vakalarında ET-1 ile CAT arasında da negatif ilişki olduğu tespit edildi ($p:0.041$). Bu da artmış olan antioksidan ajanların ET-1 seviyesinin düşük devam etmesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Aynı grupta ET-1 ile IL-8 arasında pozitif ilişkinin saptanmış olması, ($p:0.008$) ciddi enflamasyonun gelişmemesinden ve model çalışması süresince enfeksiyon gelişmemesiyle açıklanabilir.

GM-CSF, T hücreleri, endotel hücreleri, keratinositler, monosit ve fibroblastlardan salınarak endotel proliferasyonunu uyarmakta ve granülositleri aktive ederek kemik iliğinde nötrofil, eosinofil, monosit, eritroid hücreler ile megakaryosit kolonizasyonunu stimule etmektedir (89). Ayrıca immün ve enflamatuvar yanıtlarda direkt veya dolaylı olarak rol almaktadır. GM-CSF sağlıklı term ve preterm fetüslerin amnion sıvılarında tespit edilmiştir, koryoamnioniti olan kadınların serumlarında, fetal stres, enfeksiyon, erken membran rüptürü, mekonyumun AS'na karışması durumlarında da kord kanında yükseldiği bildirilmiştir (4). Venkateswaran ve ark. (211) yaptıkları çalışmada özellikle ciddi sepsis ve nötropeni olan 4 NEK gelişmiş yenidoğana verildiğinde hastaların GM-CSF'ten fayda gördüğü bildirilmiştir. Ayrıca ülseratif kolit ve otoimmün bağırsak hastalıklarının patofizyolojisinde de GM-CSF'nin etkileri gösterilmiştir (212). Bizim çalışmamızda G₁'in GM-CSF düzeyleri G₂'ye göre daha yüksek bulundu, ancak anlamlı fark tespit edilmedi (p>0.05). Bu yükseklikte G₂ olgularında ciddi hipoksik ve enflamatuvar yanıtın oluşmamasına, salınan antioksidan ajanların varlığına bağlanabilir. Çünkü bizim çalışmamızda G₂ yavrularının CAT ve SOD değerleri anlamlı olmasa da daha yüksek bulundu. Bu CAT ve SOD yüksekliğinin enflamasyon ve hipoksiden zarar gören hücrelerden sitokin salınımı ve bunun sonucu ortaya çıkan doku hasarını azalttığı bilinmektedir (213).

G₃ yavruları sadece AS ile beslendi. Verilen AS'nın biyokimyasal incelemeleri ve hücre sayımı **Tablo 4.2**'de görülmektedir. Çünkü yapılan çeşitli çalışmalarda AS içeriğinde bağırsak gelişimini uyaran mediatörlerin varlığı gösterilmiştir (214,215). Ayrıca AS'nın bağırsak hücreleri üzerindeki trofik etkisi de insan ince bağırsak hücre kültüründe de kanıtlanmıştır (216). Tavşan fetüs özofaguslarının bağlanarak gastrointestinal sistem distaline değişik çözeltilerin infüzyonla verildiği bir çalışmada AS verilenlerde normal bağırsak gelişimi görülürken "ringer laktat" verilenlerde gelişimin geri olduğu saptanmıştır (214). Trahair ve ark (215) AS, kolostrum gibi biyolojik sıvılarda yüksek konsantrasyonda bulunan "gastrin releasing peptid" in özofageal infüzyonunu ile fetal organlarda büyüme ve immün sistemin gelişmesine etkisi olduğunu ileri sürmüşlerdir. AS'nda bulunan "arginin" de fetal ve plasental gelişimde temel rol oynadığı ve argininin hidrolizi ile açığa çıkan "ornitin", "putresin", "spermin" ve "spermidin" gibi hormonal maddelerin plasental anjiogenesis, trofoblast büyümesi gibi regülatör özellikleri olan poliaminlere dönüştüğü gösterilmiştir (217). Koyunlarda,

arginin, ornitin ve poliaminlerin konsantrasyonlarının erken gestasyon döneminden itibaren hızla yükseldiği ve gebelik boyunca da AS'nda yüksek kaldığı bu AS ile yutulan poliaminlerin intestinal epitelyal hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasını desteklediği ileri sürülmektedir (218). AS ile yapılan çalışmalarda oksidatif ve antioksidatif ajanların seviyelerinde farklılıklar saptanmıştır. Gebeliğin 16. ve 19. haftalarında alınan sıvı örneklerinde gestasyonel diabetes mellitus, bakteriyel vajinosis gibi komplike hamilelik vakalarında SOD, CAT ve GPx gibi antioksidanların seviyelerinin düşük olduğu tespit edilmiştir (219). Fakat 36 nöral tüp defektli bebeği olan anneden alınan AS'nda antioksidan kapasitenin kontrol grubundan artmış olduğu saptanmıştır (220). Bizim çalışmamızda da antioksidan ajan olan SOD ($p>0.05$) ve CAT ($p:0.05$)'ın G_3 olgularında G_1 olgularının 2 kat kadar daha yüksek olduğu tespit edildi. Bu yükseklik doku hasarının yüksek olmasına, genel sirkülasyonun bozulmasına, intestinal doku perfüzyonunun bozulması ile beraber toksik maddelerin atımdaki yetersizliğe bağlanabilir. Çünkü bu gruptaki yenidoğan yavrularının büyük kısmında bağırsak perfüzyonu etkilenmiş ve bağırsak perforasyonu gözlemlenmişti. İntestinal perforasyonu olan yavruların omentum boşluklarında sıvı ile beraber bağırsak muhteviyatının varlığı da artmış oksidatif stresle beraber dolaylı olarak antioksidan ajanların artmasını da açıklayabilir. G_3 'de TNF- α ($p:0.037$) ve IL-8 ($p:0.001$) seviyeleri G_1 'e göre anlamlı ölçüde yüksek tespit edildi. Bunlarla birlikte bu grupta ET-1 ($p:0.027$) ve VEGF ($p:0.051$) kontrol grubundan daha düşük olduğu saptandı. Vasküler hasarın ve özellikle hipoksinin sonucu olarak artan bu maddelerin G_3 olgularında düşük bulunması bu maddelerin yapımı için gerekli olan proteinlerin yeterince alınmamış olmasına, alınmış olan proteinlerin enerji temin edilmesi amacıyla kullanılamamasına bağlanabilir. Bunlarla birlikte model sırasında yapılmış olan vasküler hasarın ciddi olmaması ile açıklanabilir. Ancak model uygulanması sırasında özellikle stresten sonra deneklerin genel durumlarının bozulması, batında distansiyon ve batın cildindeki disklorasyon (**Şekil 4.2**), hipotermi ve hipoperfüzyon modelinin etkili uygulandığının kanıtı olarak alınabilir. Fakat özellikle hipotermi sonrasında da benzer bulgular hipoperfüzyon olamadan da görülebilir. Literatürde de yüksek olması beklenen angiogenetik faktörler özellikle doku perfüzyonunun ciddi bozulduğu ve özellikle intrauterin kayıplarla sonlandığı durumlarda ciddi düşük bulunmuştur (221). Bu durum plasental vasküler gelişmenin ve endotelyal regülasyonun bozulmasına bağlanmıştır.

G₃'ün birinci ve ikinci günlerin sonundaki tartı alımları değerlendirildiğinde G₁ ve G₂'den daha düşük olduğu saptandı (p<0.05). Bu grubun yetersiz tartı alışı maruz kalınan ciddi strese bağlanabilir. Çünkü ciddi soğuk stres varlığında aerobik metabolizmanın bozulması ve bağırsak motilitesinin etkilenmesi ile absorpsiyon yetersizliğine bağlı kilo alım eksikliği (222). Ayrıca bağırsaklardaki hipotermi ile o bölgenin perfüzyonunun bozulması absorpsiyonun bozulmasına katkıda bulunmuş olabilir (223). Daha önceki benzer çalışmalarda NEK olan veya olmayan deneklerin AS ile beslendiği bir çalışmaya rastlanmadığından verilerimiz literatürle kıyaslanamadı. Fakat çalışmamızda uygulanan AS'nın enerji içeriğinin de oldukça düşük olması, kilo alımındaki yetersizliğin nedeni olmuş olabilir. Çünkü, bizim kullandığımız AS'ındaki glukoz 21 mg/dl ve total protein 0.7 gr/dl iken, anne sütünün incelendiği bir çalışmada anne sütünün 7.93 gr/dl laktoz ve 0.99 gr/dl protein içerdiği gösterilmiştir (224). Prematür ve yenidoğan dönemindeki beslenme modellerinde düşük osmolarite tavsiye edilmektedir. Bizim kullandığımız AS'nın osmolaritesi düşüktü fakat protein ve enerji içeriği ise yetersizdi (**Tablo 4.3**). Bu gözlemden hareketle bundan sonra yapılacak çalışmalarda düşük enerji içeriği nedeniyle AS'na glukoz ilave edilmesi veya enerji vericilerin katılması daha anlamlı sonuçların alınmasına katkıda bulunacaktır. G₃'teki yenidoğan yavruların kilo almamalarının diğer nedenleri de G₃'teki oksidan ajanların G₁'den daha fazla olmasına, TNF- α ve IL-8 gibi artmış sitokinlerin varlığına, stres ve intestinal perforasyon varlığındaki enflamasyonun devam etmesine de bağlanabilir (194,195). Ayrıca bu grupta GM-CSF seviyelerinin de G₁ olgularından düşük ölçülmesi bu grupta ciddi hipoksik ve iskemik strese bağlı olarak immun ve hematopoyetik sistemlerin etkilenmiş olabileceğinin göstergesi olarak kabul edilebilir.

Birinci ve ikinci günlerdeki ağırlık takiplerinde G₃'ün G₂'den anlamlı olarak daha az tartı alması da (p<0.05) G₂ olgularındaki anne sütünün koruyucu, enerji verici ve tedavi edici özelliklerine bağlanabilir (224). Ayrıca bilindiği gibi AS'ındaki enerji ve protein içeriğinin daha az olması da buna neden olabilir. Bunlardan başka, enflamasyona ait belirteçlerden olan IL-8 (p:0.001) ve TNF- α da G₃'te (p>0.05) yüksek olması kilo alımını engellemiş olabilir (194, 195). Oksidatif ajanlara karşı yükselmiş olan antioksidan belirteçler (CAT ve GPx) aktiviteleri de G₃ olgularında artmış olmasına rağmen (p>0.05) kilo alımı için yeterli olmamaları kilo alımını etkilemiş olabilir. Bu antioksidan enzimlerin G₃'te daha artmış bulunması uygulanan oksidan

strese yanıt olarak deneklerin enzim seviyelerinin artmasına bağlanabilir. Hem anne sütünün (137, 154, 196), hem de AS'nın (219, 220) antioksidan özellikleri daha önceki çalışmalarda ortaya konulmuştur, ancak bizim çalışmamızda anne sütü verilen yavruların hem patolojik evreleme, hem perforasyon sıklığı hem de tartı alımları kıyaslandığında oksidan hasara karşı daha dayanıklı oldukları gözlemlendi. G₃ ve G₂ yavrularının VEGF ve ET-1 düzeyleri kıyaslandığında ise, anlamlı farklılık olmamakla beraber G₃'te daha düşük saptandı (p<0.05). Bu düşüklük G₃'te hem verilen protein ve kalorinin düşüklüğü, hem de artan enflamasyona bağlı olarak artmış katabolizma ile ilişkilendirilebilir. Ayrıca G₂ vakaları anneleri ile birlikte kaldıklarından deney süresi içinde soğuk ortamdaki anneleri tarafından korunmuş olduklarından hipotermik stres daha az katkıda bulunmuş olabilir. Her iki grupta da hipotermik ve hipoksik stres oluşturulmasına karşın G₃ olgularında perforasyon görülmesi bu grupta periyodik gerçekleştirilen ani beslenmeye sekonder mide ve bağırsakların ani dilatasyonuna bağlanabilir (225). Perfüzyonu bozulmuş ve hipotermiye maruz kalmış intestinal duvarların aniden gerilmesi, bağırsak duvarının beslenmesinin bozulması ve perforasyonuna insanlarda görülen ileus kliniğine benzer şekilde katkıda bulunmuş olabilir. Halbuki anne sütü ile beslenen G₂ olguları daha uzun sürede ve kendi güven ortamında annesi tarafından beslenmişlerdi. Bu çalışmanın sonuçlarına göre bundan sonraki sıçan modellerine dayalı araştırma çalışmalarda sıçanların infüzyon şeklinde beslenmelerinin sağlanmasının daha güvenilir sonuçlar elde edilebileceğini vurgulamaktadır. Ayrıca perfüzyon bozukluğu gelişmesine düşük enerji ve protein içeriği olan AS da katkıda bulunmuş olabilir. Çünkü her ne kadar insan AS kullanılmış olsa da insan AS'ına karşı yavru bağırsak mukozasında allerjik reaksiyon gelişmiş olabilir ve bu da perforasyonu gelişmesine katkıda bulunmuş olabilir. Ayrıca her ne kadar biz AS'nı ideal şartlarda temin etmiş olsak da AS'nının içerisinde verniks kazeoza varlığı da bağırsak cidarında değişikliklerin oluşmasına katkıda bulunabilir. Çünkü verniks kazeozanın kendi vax/parafine benzer yapısı bağırsağı tıkadığı gibi bağırsak lümenine yapışarak o bölgelerde ciddi mukozal hasara da neden olmuş olabilir (226).

Birinci ve ikinci günlerde değerlendirilen G₃ ve G₄'ün tartı alımları kıyaslandığında iki grup arasında anlamlı farklılık tespit edilmedi (p>0.05). Doku hasarına için strese maruz bırakılan bu grupların takibinde tek farklılık beslenme

şekilleri idi. G₃, kalori ve protein yönünden G₄'ten geri idi, fakat G₄'e verilen mamanın solüt yükünün G₃'e verilen AS'na göre daha yüksek olması da G₄ denekleri için önemli risk faktörü idi. Solüt yükü yüksek besinlerin intestinal mukozanın yapısını bozarak NEK'e neden olabileceği önceki çalışmalarda gösterilmiştir (135, 136). Çalışmamızda kullandığımız AS'nın osmolaritesi 252 mosm/L olarak hesaplandı (227). Bebek beslenmesinde verilen anne sütünün ve çeşitli ürünlerin solüt yüklerinin incelendiği bir çalışmada anne sütünün osmolaritesi 300 mosm/L iken, yenidoğanlara verilen formula mamanın osmolaritesi 400 mosm/L olarak hesaplanmıştır (136). Yani G₄ yavrularının daha yüksek solüt yük ile beslendikleri bilinmektedir. Buna göre G₄ yavrularına verilen formula mama intestinal mukozanın yapısını bozarak (135), peristaltizmi etkileyerek ve bağırsak pasajının uzamasına neden olarak (228) intestinal perfüzyonun bozulması ve nekroza giden süreçte rol oynamış olabilir. Bu iki grubun oksidan-antioksidan parametreleri değerlendirildiğinde ise, oksidan seviyeyi gösteren MDA düzeylerinde anlamlı farklılık olmamakla birlikte G₄'te daha yüksek saptandı (p>0.05). CAT enzim seviyesi G₃'te anlamlı olarak daha yüksek (p<0.05) iken, GPx ise G₄'te anlamlı olarak daha yüksek bulundu (p<0.05). Bu durum denek sayısının yetersizliği ve NEK kliniğinin yeterince ortaya çıkmadan deneklerin kaybedilmesi ile ilgili olabilir. G₃ yavrularında IL-8 düzeyinin daha yüksek olduğu saptanırken (p>0.05), G₄ olgularında ise TNF- α 'nın daha yüksek olduğu (p>0.05) değerlendirildi. Bu durum her iki grubun stres ile birlikte G₃ olgularındaki enerji-protein yetersizliğinden, G₄ olgularında ise yüksek solüt yükünden kaynaklanabilir. Ayrıca AS ile formüle mamanın organ perfüzyonları üzerine etkileri incelendiğinde ise VEGF'in AS alan yavrularda formüle ile beslenenlerden daha fazla olduğu (p>0.05) görüldü. Bu yükseklik erken dönemde enerji yetersizliğine bağlı organ hasarından kaynaklanabilir. Ayrıca AS içinde bulunan çeşitli ajanların bağırsak ve diğer hasarlanmış dokularının remodelingini arttırmak için yükselmiş olabilir (229). Bu da doku hasarının düzeltilmesine katkıda bulunduğundan AS özellikle formüle mama sonrası ortaya çıkan bağırsak hasarının tedavisi amacıyla kullanılabilirliğinin bir göstergesi olarak alınabilir. Ayrıca yapılan kıyaslamada TNF- α 'nın formül mama ile beslettirilen yavrularda anlamlı olmasa da daha yüksek olduğu saptandı. G₃ olgularında TNF- α 'nın daha düşük olması verilen AS'nın enflamasyonu azaltıcı bir rol oynadığının göstergesi olarak kabul edilebilir. Özellikle formüle mama ile beslenen yenidoğanlarda TNF- α 'nın aracılık etmiş olduğu enflamasyon ve diğer reaksiyonları azaltmak amacıyla da kullanılabilirliğinin bir göstergesi olarak alınabilir.

Ayrıca G₃ ile G₄ arasında yapılan değerlendirmede G₃ olgularındaki GM-CSF değerinin G₄ olgularından daha düşük olduğu (p>0.05). görüldü. GM-CSF'in formüla mama ile beslenenlerde daha yüksek olması intestinal hasarın bu olgularda daha yüksek olmasından kaynaklanabilir. Bizim çalışmamızda G₃ olgularının %36.4'ünde perforasyon gözlemlenirken, G₄ olgularının ise %60'ında perforasyon olduğu ve oluşan perforasyon ile ilişkili olarak bağırsaktaki NEK değişiklikleri kıyaslandığında G₃ olgularının 3'ünde hiçbir NEK bulgusu saptanmazken, %55'inde Evre 1 ve %27'sinde ise Evre 2 NEK bulguları saptandı. Halbuki G₄ olgularının %100'ünde NEK bulguları mevcuttu ve bunun %40'ı Evre 1, %50'si Evre 2 ve %4.8'inde Evre 3'tü (p<0.05). Bu da AS'nın formüla mama ile beslenenlere kıyasla daha az NEK'e yol açabileceğinin bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Bu düşük oran AS'nın düşük viskozitesine, düşük solüt yüküne, düşük oksidatif strese yol açmasına, yüksek antioksidatif özelliğine, düşük enflamatuvar cevaba yol açması ile beraber vasküler yapıları etkileyerek remodelingi arttırmasına bağlanabilir.

G₃ ile G₅ arasında yapılan değerlendirmede ise formüla mamaya AS ilave edilmesi ile NEK bulgularının gelişiminin azaltılabileceği saptandı. Çünkü G₄ olgularının %60'ındaki perforasyon AS eklenen G₅'te %30'a geriledi. Ayrıca G₄ olgularının %60'ı patolojik evrelemede Evre 2 ve üzeri iken G₅'te bu %20'ye düşmüştü (**Tablo 4.4**). Bu düşüşte AS'nın oksidatif stresi G₄'den daha fazla düşürmesine bağlanabilir. Çünkü G₅'in MDA düzeyi G₄ olgularından daha düşüktü (p>0.05). Ayrıca perforasyon ve NEK bulgularının azalması AS katılması ile formüla mama alanlarda oluşmuş olan antioksidan faktörlerin seviyelerini de etkileyerek katkıda bulunmuş olabilir. Çünkü SOD aktivitesinde belirgin değişiklik olmamakla birlikte G₅ olgularında CAT seviyesinin 1/3 oranında yükseldiği saptandı (p>0.05). Ayrıca enflamasyon göstergelerinden olan IL-8 seviyesinin sabit kalmasına ve hatta düşmesine sebep olurken, TNF- α düzeyinde de artışa yol açmıştır. TNF- α 'daki bu yükseliş TNF- α reseptörlerinin bağlanmasına bağlanabilir (230). Bunlarla birlikte vasküler hasarın göstergesi olarak artan ET-1 düzeyi G₄ olgularında oldukça yüksek iken bunun belirgin olarak düştüğü saptanmıştır (p>0.05) (**Tablo 4.5**). Ayrıca VEGF seviyesinde bir değişikliğe yol açtırmaması da katkıda bulunmuş olabilir. Bu da eksik olan enerjisini formüla mamadan sağlayan AS'nın vasküler hasarı minimale indirdiğinin bir göstergesi olarak kabul edilir. Bunlardan başka perforasyon ve NEK kriterlerindeki azalmaya doku

düzeyindeki immün modulasyonda rol oynayan GM-CSF seviyesini arttırarak katkıda bulunmuş olabilir. Çünkü 5-FU ile oluşturulan mukozitlerin tedavisinde GM-CSF kullanıldığında yara iyileşmesinin olduğu kanıtlanmıştır (231). Ayrıca kolon kript epiteli ile yapılan ve endojen GM-CSF kullanıldığında mukozal remodelingi etkileyerek yara iyileşmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (232). Bunun sonucu olarak G₅ olgularının G₄ ve G₃ olgularından daha uzun süre ile yaşadıkları saptanmış olması AS'nın formüle mama ile birlikte kullanıldığında NEK insidansını azaltabileceğinin bir göstergesi olarak kabul edilebilir.

5.1 SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada üniversite hastanemizde toplamda tek anneden doğan toplamda 47 *Sprague Dawley* cinsi sıçan yavrusu kullanılarak 5 gruplu bir deneysel NEK modeli oluşturuldu. NEK oluşturulması için hipoksi ve hipotermi kullanıldı ve insan AS ile formüle mama verilen yavruların klinik, laboratuvar ve patolojik bulguları normal kontrol grubu ile kıyaslandı.

Grupların ortalama doğum ağırlıkları değerlendirildiğinde gruplar arasında farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Fakat ilk 24. saatin sonunda G₁ grubunun G₂ ($p<0.05$), G₃ ($p<0.05$) ve G₄ ($p<0.05$) gruplarından daha fazla kilo aldığı saptandı.

- IL-8 ($p:0.001$) ve TNF- α ($p:0.005$) düzeyleri ile tartı alımlarının az olması arasında ilişki saptandı.
- Deneklerin kilo almaları ile VEGF arasında pozitif korelasyon gözlemlendi ($p:0.005$).
- G₁ olgularının diğer gruplara göre daha fazla kilo alması anne sütü ile beraber strese maruz kalmamalarına bağlandı. G₂ olgularındaki strese rağmen tartı artışı olguların anne sütü ile beslenmesi, anne sütünün içindeki antioksidan ajanların ve koruyucu faktörlerin varlığına bağlandı.
- Üçüncü ve dördüncü günlerde hayatta kalan G₁ ve G₂ kıyaslandığında G₁'in daha fazla tartı aldığı görüldü ($p<0.05$).
 - o Strese maruz bırakılan G₂'de oksidan ve enflamatuvar parametrelerin daha yüksek olmasına bağlanabilir.

- G₃ olgularındaki kilo alım yetersizliği bu olguların maruz kaldıkları stres ile birlikte AS'nın içindeki enerji ve protein gibi temel maddelerin yetersizliğine bağlandı.
- G₅ olgularında formula mamaya AS ilave edilmesi ilk gün içinde tartı alımında gecikme yaşanmamasına katkıda bulunmuştur.
 - o Enerji ve protein yetersizliği nedeniyle bundan sonraki yapılacak çalışmalarda amnion sıvısının içine enerji ve protein ilave edilmesi deneklerin kilo almalarına katkıda bulunacaktır.
- İkinci gün sonunda da G₅ olgularının kilo artışının G₃ ve G₄'den daha iyi olduğu görüldü.
 - o Bu kilo artışının iyi olması formula mamaya katılan AS'nın içindeki koruyucu maddelerin ve antioksidan maddelerin yoğun olmasına
 - o AS'nın katılması ile formula mama konsantrasyonunun ve osmolaritesinin azalmasına
 - o Eksik olan enerji ve proteinin ilavesi ile kilo alımının devam ettirilebileceğinin göstergesi olarak kabul edilebilir.
- İkinci günde G₃ ve G₄'de kilo artışı gözlemlenmedi, hatta G₃ deneklerinde tartı kaybı yaşandı.
 - o Strese maruz bırakılan yavruların erkenden ölmesi
 - o Bu deneklerdeki enfeksiyonsuz enflamasyonun ortaya çıkması
 - o IL-8 ve TNF- α düzeylerinin yüksek bulunmasına bağlanabilir.
 - o G₃ deneklerin beslenmesinde kullanılan AS'nın enerji ve protein içeriğinin yetersiz olmasına
- G₁ ve G₂ de perforasyon görülmezken en sık perforasyon G₄ deneklerinde mevcuttu.
 - o G₁ ile G₂ yavrularına perforasyon gözlemlenmemesi
 - o G₁ ve G₂ yavrularının anne sütü ile beslenmesine ve G₂ yavrularının annelerinin yanında kalmalarına
 - o G₁ yavrularında oluşan MDA'nın G₂ olgularından farklı olmaması anne sütünün antioksidan özelliği ile oluşan stresi baskılamasına
 - o G₂ olgularında G₁ olgularının iki katı daha fazla olmasına rağmen oluşan TNF- α , IL-8 ve GM-CSF gibi ajanların etkilerinin anne sütü ile nötralize etmesine

- G₂ olgularında oluşan ET-1 ve VEGF gibi vasküler remodelingi sağlayan faktörlerin anne sütünün etkisi ile değişmelerine bağlanabilir.
- G₄ deneklerinde intestinal perforasyonun fazla olması;
 - Verilen formula mamanın yüksek solüt yükü ile mukozaya ve daha bazalde bulunan doku tabakalarına zarar vermesi buna neden olabilir.
 - G₄ yavrularının G₂ yavrularından MDA değerlerinin yüksek olması formula ile gelişen oksidatif strese, G₄ olgularında CAT değerinin G₂ olgularından daha düşük olması antioksidan ajanların daha düşük olmasına bağlanabilir. Ayrıca TNF- α , IL-8 ve GM-CSF düzeylerinin G₄ olgularında G₂ olgularından daha yüksek olması formulanın enflamatuar sitokinlerin ortaya çıkmasını kolaylaştırarak perforasyona neden olduğunun göstergesidir. Bunlardan başka damarlanmanın ve böylelikle de remodelingin göstergesi olan VEGF düzeylerinin G₄ olgularında G₂ olgularından daha düşük bulunması perforasyon nedeni olabilir.
- G₄ yavrularında G₃ yavrularından daha fazla perforasyon gözlemlenmesi;
 - G₄ olgularında MDA'nın daha yüksek ve CAT'ın daha düşük bulunması amnion sıvısının oksidatif stresi azaltarak antioksidan ajanları azaltarak perforasyonun önlemede etkili olduğuna
 - GM-CSF ve TNF- α 'nın G₄ olgularında G₃ olgularından daha fazla olması AS'nın antiinflamatuar özellikleri ile perforasyon gelişimini engellediğinin göstergesi olarak kabul edilebilir.
 - ET-1'de belirgin değişiklik olmadan VEGF'ün G₄ olgularında azalmış olması AS'nın G₃ olgularında G₄'e göre vaskülogenezise katkıda bulunarak NEK gelişimini engellemede rol aldığının göstergesi olarak alınabilir.
 - Ayrıca G₃'ün daha erken ölmüş olmaları perforasyon gelişmeden enerji eksikliği nedeniyle ölmelerine bağlanabilir.
 - Beslenme içeriğinde anne sütü veya AS'nda olduğu bilinen koruyucu etkenlerin yokluğuna bağlanabilir.
- G₅ yavrularında G₄ yavrularından daha az perforasyon gözlemlendi

- Her iki grupta da perforasyon gözlemlenmesi aralıklı yüksek volümle beslenmelerine bağlı intestinal yapıların dilatasyonu ve perfüzyonlarının bozulmasına bağlanabilir
- AS ilavesi ile MDA düzeyinin düşmüş olması ve CAT değerinin artmış olması AS'nin oksidatif stresi azaltması ve antioksidan ajanların gelişimini arttırmasına bağlanabilir
- G₅ olgularında AS verilmesi TNF- α 'yı etkilemese de IL-8 düzeyini azaltmasına,
- AS'nin ET-1 düzeyini ciddi etkilemese de VEGF düzeyini hafif arttırması ile açıklanabilir.
- Eklenen AS'nin formula mama solüt yükünü azaltmasına, viskoziteyi azaltmasına bağlanabilir.
- G₃ yavrularında perforasyonun G₂ yavrularına göre fazla olması ise
 - G₃ olgularında MDA, SOD ve GPx değeri çok değişmez iken CAT değeri normalin iki katına çıkmasına rağmen oluşan stres ile birlikte hipoglisemi ve protein yetersizliğinin ciddiyetine
 - G₃ olgularında GM-CSF, TNF- α ve IL-8 düzeylerinin enerji ve protein yetersizliğine sekonder artmasına
 - G₃ olgularında angiogenik faktörlerin düşük bulunmasına bağlanabilir.
 - G₃ olgularında AS toplanması sırasında verniks kazeoza gibi ilave ajanların barsak cidarına yapışarak mukozal harabiyete neden olması
 - Aralıklı yüksek volümle beslenmelerine bağlı gastrik ve intestinal dilatasyona bağlanabilir.
- Histopatolojik evrelemede G₁ ve G₂ yavrularında mukozal hasar gözlemlenmedi.
 - G₁ ile G₂ arasında mukozal hasar yönünden farklılık saptanmaması;
 - G₁ ve G₂ yavrularının anne sütü ile beslenmesine ve G₂ yavrularının annelerinin yanında kalmalarına
 - G₂ yavrularında oluşan MDA'nın G₂ olgularından farklı olmaması anne sütünün antioksidan özelliği ile oluşan stresi baskılamasına
 - G₂ olgularında G₁ olgularının iki katı daha fazla olmasına rağmen oluşan TNF- α , IL-8 ve GM-CSF gibi ajanların etkilerinin anne sütü ile nötralize edilmesine

- G₂ olgularında oluşan ET-1 ve VEGF gibi vasküler remodelingi sağlayan faktörlerin anne sütünün etkisi ile değişmelerine bağlanabilir.
- Etkisiz hipotermik ve iskemik stres oluşturulmasına bağlanabilir.
- G₃ olgularında histopatolojik değerlendirmede G₂ olgularından daha fazla ancak G₄ olgularından daha az semptom saptandı.
 - G₄ olgularında MDA'nın daha yüksek ve CAT'ın daha düşük bulunması AS'nin oksidatif stresi azaltarak NEK'in önlenmesinde etkili olduğuna
 - GM-CSF ve TNF- α 'nın G₄ olgularında G₃ olgularından daha fazla olması AS'nin antienflamatuar özellikleri ile NEK gelişimini engellediğinin göstergesi olarak kabul edilebilir.
 - ET-1'de belirgin değişiklik olmadan VEGF'ün G₄ olgularında azalmış olması AS'nin G₃ olgularında G₄'e göre vaskulogenesise katkıda bulunarak NEK gelişimini engellemede rol aldığının göstergesi olarak alınabilir.
 - Ayrıca G₃'ün daha erken ölmüş olmaları NEK gelişmeden enerji eksikliği nedeniyle ölmelerine bağlanabilir.
- G₃ olgularında G₅ olgularından daha az histopatolojik değişiklik saptandı. Bundan;
 - Oksidatif ve antioksidatif ajanlarının AS ilavesi ile etkilenmesine
 - GM-CSF ve TNF- α 'nın G₅ olgularında daha yüksek bulunmasına
 - ET-1 ve VEGF seviyelerinin G₅'te daha düşük bulunmasına bağlanabilir
 - İlave edilen AS'nin G₅ olgularında formula mamanın solüt yükünü azaltmasına
 - AS ile beraber verilen formula mamanın enerji ve protein ihtiyacını karşılaması katkıda bulunmuş olabilir
- G₃ olgularında G₄ olgularına göre yapılan histopatolojik kıyaslamada daha az NEK bulgusuna rastlandı. Bu;
 - G₄ olgularında MDA'nın daha yüksek ve CAT'ın daha düşük bulunması AS'nin oksidatif stresi azaltarak antioksidan ajanları azaltarak NEK gelişimini önlemede etkili olduğuna

- GM-CSF ve TNF- α 'nın G₄ olgularında G₃ olgularından daha fazla olması AS'nin antienflamatuvar özellikleri ile NEK gelişimini engellediğinin göstergesi olarak kabul edilebilir.
- ET-1'de belirgin değişiklik olmadan VEGF'ün G₄ olgularında azalmış olması AS'nin G₃ olgularında G₄'e göre vaskulogenesise katkıda bulunarak NEK gelişimini engellemede rol aldığıının göstergesi olarak alınabilir.
- Ayrıca G₃ yavrularının daha erken ölmüş olmaları NEK gelişmeden enerji eksikliği nedeniyle ölmelerine bağlanabilir.
- G₃ ve G₄ olgularında aralıklı yüksek volümle beslenme NEK bulgularının gelişimine katkıda bulunmuş olabilir.
- G₁ ile G₂ olgularının yaşam süreleri benzerdi. Bu benzerlikte;
 - G₁ ve G₂ yavrularının anne sütü ile beslenmesine ve G₂ yavrularının annelerinin yanında kalmalarına
 - G₂ yavrularında oluşan MDA'nın G₂ olgularından farklı olmaması anne sütünün antioksidan özelliği ile oluşan stresi baskılamasına
 - G₂ olgularında G₁ olgularının iki katı daha fazla olmasına rağmen oluşan TNF- α , IL-8 ve GM-CSF gibi ajanların etkilerinin anne sütü ile nötralize etmesine
 - G₂ olgularında oluşan ET-1 ve VEGF gibi vasküler remodelingi sağlayan faktörlerin anne sütünün etkisi ile değişmelerine
 - Etkisiz hipotermik ve iskemik stres oluşturulmasına bağlanabilir
- G₂ olguları ile G₃ olguları kıyaslandığında;
 - G₃ olgularında MDA, SOD ve GPx değeri çok değişmez iken CAT değeri normalin iki katına çıkmasına rağmen oluşan stres ile birlikte hipoglisemi ve protein yetersizliğinin ciddiyetine
 - G₃ olgularında GM-CSF, TNF- α ve IL-8 düzeylerinin enerji ve protein yetersizliğine sekonder artmasına
 - G₃ olgularında angiogenik faktörlerin düşük bulunmasına bağlanabilir
 - G₃ olgularında AS toplanması sırasında verniks kazeoza gibi ilave ajanların barsak cidarına yapışarak mukozal harabiyete neden olması

- Aralıklı yüksek volümle beslenmelerine bağlı gastrik ve intestinal dilatasyona bağlanabilir
- G₃ ile G₄ yavruların yaşam süreleri kıyaslandığında
 - G₃ olgularında enerji malnutrisyonu, G₄'de solut yükü yaşam sürelerinin kısalığına katkıda bulunmuş olabilir.
- G₃ ile G₅ arasında yapılan yaşam sürelerinin kıyaslanmasında G₃ grubun daha kısa yaşadığı saptandı.
 - G₃ olgularında kısa olması enerji ve protein eksikliğine, G₅ olgularında artmış olması AS ile beraber verilen formüla mamanın enerji ve protein ihtiyacını karşılaması katkıda bulunmuş olabilir.
- G₄ ile G₅ ile yaşam süreleri yönünden kıyaslandığında; G₅ olgularının G₄'den daha uzun yaşadığı gözlemlendi. Bu;
 - İlave edilen AS'nın G₅ olgularında formüla mama solüt yükünü azaltmasına, AS ile beraber verilen formüla mamanın enerji ve protein ihtiyacını karşılaması katkıda bulunmuş olmasına ve ilave edilen AS'nın antienflamatuar ile antioksidan özelliklerine bağlanabilir.

Sonuç olarak; enerji ve proteinden yoksun amnion sıvısının formüla mama ile birlikte yenidoğanların beslenmesinde kullanımları NEK gelişimini azaltacaktır. Buna yönelik kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Stoll BJ, Kliegman RM. Neonatal Necrotising enterocolitis. In Nelson Textbook of Pediatrics. Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB 17th ed pp.590-2. Philadelphia. W.B. Saunders Company 2004.
2. Bhatia J. Strategies to prevent necrotising enterocolitis. Chin Med J 2010; 123:2759-65.
3. Claud EC. Neonatal Necrotizing Enterocolitis Inflammation and Intestinal Immaturity. Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem 2009; 8:248-59.
4. Underwood MA, Gilbert WM, Sherman MP. Amniotic fluid: not just fetal urine anymore. J Perinatol 2005; 25:341-8.
5. Smith CG. In the critically ill, nothing-by-mouth infant, would enteral administration of simulated amniotic fluid improve feeding tolerance compared with the current practice of no therapy? An evidence-based review. Neonatal Netw 2011; 30:105-15.
6. Ceylan A, Arslan S, Kırımı E, Öner AF. Nekrotizan Enterokolit: Patogenez, Tanı, Tedavi ve Yeni Görüşler Van Tıp Dergisi 1998; 5:3-5.
7. Hsueh W, Caplan MS, Qu XW, Tan XD, De Plaen IG, Gonzalez-Crussi F. Neonatal necrotizing enterocolitis: clinical considerations and pathogenetic concepts. Pediatr Dev Pathol 2003; 6:6-23.
8. Deplancke B, Gaskins HR. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. Am J Clin Nutr 2001; 73:1131S-41S.
9. Forstner JF, Oliver MG, Sylvester FA. Production, structure, and biologic relevance of gastrointestinal mucins. In: Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL, eds. Infections of the gastrointestinal tract. New York: Raven Press 1995; 71-88
10. Brockhausen I, Schutzbach J, Kuhns W. Glycoproteins and their relationship to human disease. Acta Anat (Basel) 1998; 161:36-78.
11. Matsuo K, Ota H, Akamatsu T, Sugiyama A, Katsuyama T. Histochemistry of the surface mucous gel layer of the human colon. Gut 1997; 40:782-9.
12. Sheahan DG, Jervis HR. Comparative histochemistry of gastrointestinal mucosubstances. Am J Anat 1976; 146:103-31.

13. Robertson AM, Wright DP. Bacterial glycosulphatases and sulphomucin degradation. *Can J Gastroenterol* 1997; 11:361-6.
14. Filipe MI, Sandey A, Carapeti EA. Goblet cell mucin in human foetal colon, its composition and susceptibility to enzyme degradation: a histochemical study. *Symp Soc Exp Biol* 1989; 43:249-58.
15. Hill RR, Cowley HM, Andremont A. Influence of colonizing microflora on the mucin histochemistry of the neonatal mouse colon. *Histochem J* 1990; 22:102-5.
16. Cebra JJ. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am J Clin Nutr* 1999; 69:1046S-51S.
17. Chu SH, Walker WA. Bacterial toxin interaction with the developing intestine. *Gastroenterology* 1993; 104:916-25.
18. Corfield AP, Wagner SA, Clamp JR, Kriaris MS, Hoskins LC. Mucin degradation in the human colon: production of sialidase, sialate O-acetyltransferase, N-acetylneuraminidase, arylesterase, and glycosulfatase activities by strains of fecal bacteria. *Infect Immun* 1992; 60:3971-8.
19. Belley A, Keller K, Gottke M, Chadee K, Goettke M. Intestinal mucins in colonization and host defense against pathogens. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60:10-5.
20. Byrd JC, Yunker CK, Xu QS, Sternberg LR, Bresalier RS. Inhibition of gastric mucin synthesis by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2000; 118:1072-9.
21. Vimal DB, Khullar M, Gupta S, Ganguly NK. Intestinal mucins: the binding sites for *Salmonella typhimurium*. *Mol Cell Biochem* 2000; 204:107-17.
22. Bisailon M, Senechal S, Bernier L, Lemay G. A glycosyl hydrolase activity of mammalian reovirus sigma1 protein can contribute to viral infection through a mucus layer. *J Mol Biol* 1999; 286:759-73.
23. de Repentigny L, Aumont F, Bernard K, Belhumeur P. Characterization of binding of *Candida albicans* to small intestinal mucin and its role in adherence to mucosal epithelial cells. *Infect Immun* 2000; 68:3172-9.
24. Jones GW. The attachment of bacteria to the surface of animal cells. In: Reissig JL, ed. *Microbial interactions*. London: Chapman & Hall, 1977; 139-76.
25. Hoskins LC. Mucin degradation in the human gastrointestinal tract and its significance to enteric microbial ecology. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1992; 5:205-12.

26. Vieten D, Cornfield A, Carroll D, Ramani P, Spicer R. Impaired mucosal regeneration in neonatal necrotizing enterocolitis. *Pediatr Surg Int* 2005; 21:153-60.
27. Neu J, Douglas M. Gastrointestinal Development: Implications for Infant Feeding. *Nutrition in Pediatrics*. 4th ed 2008; 241-9.
28. Shen L, Weber CR, Raleigh DR, Yu D, Turner JR. Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annu Rev Physiol* 2011; 73:283-309.
29. http://www.thefullwiki.org/Medical_Physiology/Gastrointestinal_Physiology/Digestion_%26_Absorption
30. Sanderson IR. The physicochemical environment of the neonatal intestine. *Am J Clin Nutr* 1999; 69:1028S-34S.
31. Stadnyk AW. Cytokine production by epithelial cells. *FASEB J* 1994; 8:1041-7.
32. Gebert A, Rothkotter HJ, Pabst R. M cells in Peyer/s patches of the intestine. *Int Rev Cytol* 1996; 167:91-159.
33. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:331-41.
34. Krivonos VA. Role of epithelial basement membrane of the small intestine in providing immunologic homeostasis. *Arkh Patol* 1979; 41:48-54.
35. Perreault N, Herring-Gillam FE, Desloges N, Bélanger I, Pageot LP, Beaulieu JF. Epithelial vs mesenchymal contribution to the extracellular matrix in the human intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248:121-6.
36. Linda C. Interactions Mediating Bacterial Translocation in the Immature Intestine. *J Nutr* 2000; 130:432S-6S.
37. Başaran UN, Celayir S, Eray N, Oztürk R, Senyüz OF. The effect of an H2-receptor antagonist on small-bowel colonization and bacterial translocation in newborn rats. *Pediatr Surg Int* 1998; 13:118-20.
38. Hyman PE, Clarke DD, Everett SL, Sonne B, Stewart D, Harada T et al. Gastric acid secretory function in preterm infants. *J Pediatr* 1985; 106:467-71.
39. Guillet R, Stoll BJ, Cotten CM, Gantz M, McDonald S, Poole WK et al. Association of H2-blocker therapy and higher incidence of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics* 2006;117:e137-42.

40. Terrin G, Passariello A, De Curtis M. Ranitidine is associated with infections, necrotizing enterocolitis, and fatal outcome in newborns. *Pediatrics* 2012;129:e40-5.
41. Milla PJ. Intestinal motility during ontogeny and intestinal pseudoobstruction in children. *Pediatr Clin North Am* 1996;43:511-32.
42. Berseth CL. Gastrointestinal motility in the neonate. *Clin Perinatol* 1996;23:179-90.
43. Lau C, Smith EO, Schanler RJ. Coordination of suck-swallow and swallow respiration in preterm infants. *Acta Paediatr Jpn* 2003;92:721-7.
44. Cavell B. Reservoir and emptying function of the stomach of the premature infant. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1982;296:60-1.
45. Lebenthal E, Siegel M. Understanding gastric emptying: Implications for feeding the healthy and compromised infant. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1985;4:1-3.
46. Hyman PE, Abrams C, Dubois A. Effect of metoclopramide and bethanechol on gastric emptying in infants. *Pediatr Res* 1985;19:1029-32.
47. Kudsk KA. Current aspects of mucosal immunology and its influence by nutrition. *Am J Surg* 2002;183:390-8.
48. Ganessunker D, Gaskins HR, Zuckermann FA, Donovan SM. Total parenteral nutrition alters molecular and cellular indices of intestinal inflammation in neonatal piglets. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1999;23:337-44.
49. Hackam DJ, Upperman JS, Grishin A, Ford HR. Disordered enterocyte signaling and intestinal barrier dysfunction in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 2005;14:49-57.
50. Salminen S, Isolauri E, Salminen E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenge. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1996;70:347-58.
51. Sherman MP. New concepts of microbial translocation in the neonatal intestine: mechanisms and prevention. *Clin Perinatol* 2010;37:565-79.
52. Benoit R, Rowe S, Watkins SC. Pure endotoxin does not pass across the intestinal epithelium in vitro. *Shock* 1998;10:43-7.
53. Shen L, Turner JR. Role of epithelial cells in the initiation and propagation of intestinal inflammation. Eliminating the static: tight junction dynamics exposed. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290: G577-82.

54. Lin PW, Stoll BJ. Necrotising enterocolitis. *Lancet* 2006;368:1271-83.
55. Durmuş A, Ünsaldı E. Serbest Oksijen Radikalleri, Antioksidanlar ve Kemik İyileşmesi. *Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları* 2005;3:20-7.
56. Grisham MB, Hernandez CA, Granger N. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol* 1986;251:567-74.
57. Aghajanian A, Wittchen ES, Allingham MJ, Garrett TA, Burridge K. Endothelial cell junctions and the regulation of vascular permeability and leukocyte transmigration. *J Thromb Haemost* 2008;6:1453-60.
58. Granger DN, Senchenkova E. *Inflammation and the Microcirculation*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences 2010:10.
59. Altan N, Dinçel A, Koca C. Diabetes Mellitus and Oxidative Stress. *Turk J Biochem* 2006;31:51-6.
60. Ozdemir R, Yurttutan S, Sarı FN. Antioxidant effects of N-acetylcysteine in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2012;47:1652-7.
61. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984;222:1-15.
62. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282:C227.
63. Aydemir C, Dilli D, Uras N. Total oxidant status and oxidative stress are increased in infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2011;46:2096-100.
64. Perrone S, Tataranno ML, Negro S. May oxidative stress biomarkers in cord blood predict the occurrence of necrotizing enterocolitis in preterm infants? *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012;25 Suppl 1:128-31.
65. Ford H, Watkins S, Reblock K, Rowe M. The role of inflammatory cytokines and nitric oxide in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 1997;32:275-82.
66. Nowicki PT. Ischemia and necrotizing enterocolitis: where, when, and how. *Semin Pediatr Surg* 2005;14:152-8.
67. Hsueh W, De Plaen IG, Caplan MS, Qu XW, Tan XD, Gonzalez-Crussi F. Neonatal necrotizing enterocolitis: clinical aspects, experimental models and pathogenesis. *World J Pediatr* 2007; 3:17-29.
68. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 2003; 83:835-70.

69. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 2007; 127:514-25.
70. Frost B, Jilling T. The importance of pro-inflammatory signaling in neonatal NEC. *Semin Perinatol* 2008; 32:100-6.
71. Abreu MT, Fukata M, Arditi M. TLR signaling in the gut in health and disease. *J Immunol* 2005; 174:4453-60.
72. Wells JM, Loonen LM, Karczewski JM. The role of innate signaling in the homeostasis of tolerance and immunity in the intestine. *Int J Med Microbiol* 2010; 300:41-8.
73. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002; 109(Suppl):S81-96.
74. Claud EC, Lu L, Anton PM, Savidge T, Walker WA, Cherayil BJ. Developmentally regulated IkappaB expression in intestinal epithelium and susceptibility to flagellin-induced inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:7404-8.
75. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:499-511.
76. Fukata M, Michelsen KS, Eri R. Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288:G1055-G65.
77. Leaphart CL, Cavallo J, Gripar SC, Cetin S, Li J, Branca MF et al. A critical role for TLR4 in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis by modulating intestinal injury and repair. *J Immunol* 2007; 179:4808-20.
78. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 2001; 11:372-7.
79. Minekawa R, Takeda T, Sakata M, Hayashi M, Isobe A, Yamamoto T et al. Human breast milk suppresses the transcriptional regulation of IL-1 induced NF- κ B signaling in human intestinal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287:C1404-11.
80. Dinarello CA, Gelfand JA, Wolff SM. Anticytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome. *JAMA* 1993; 269:1829-35.

81. McCabe RP, Secrist H, Botney M, Egan M, Peters MG. Cytokine mRNA expression in intestine from normal and inflammatory bowel disease patients. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 66:52-8.
82. Viscardi RM, Lyon NH, Sun CC, Hebel JR, Hasday JD. Inflammatory cytokine mRNAs in surgical specimens of necrotizing enterocolitis and normal newborn intestine. *Pediatr Pathol Lab Med* 1997; 17:547-59.
83. Nakamura M, Saito H, Kasanuki J, Tamura Y, Yoshida S. Cytokine production in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1992; 33:933-7.
84. Cominelli F, Nast CC, Clark BD, Schindler R, Lierena R, Eysselein VE et al. Interleukin-1 gene expression, synthesis and effect of specific IL-1 receptor blockade in rabbit immune complex colitis. *J Clin Invest* 1990; 86:972-80.
85. Romagnoli C, Frezza S, Cingolani A, De Luca A, Puopolo M, De Carolis MP. Plasma levels of interleukin-6 and interleukin-10 in preterm neonates evaluated for sepsis. *Eur J Pediatr* 2001; 160:345-50.
86. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology* (6th Edition). St Louis: Mosby 2001;480.
87. Goepfert AR, Andrews WW, Waldemar C, Ramsey PS, Cliver SP, Goldenberg RL. Umbilical cord plasma interleukin-6 concentrations in preterm infants and risk of neonatal morbidity. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191:1375-81.
88. Harris MC, Costarino AT Jr, Sullivan JS, Dulkerian S, McCawley L, Corcoran L. Cytokine elevations in critically ill infants with sepsis and necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1994; 124:105-11.
89. Kılıçturgay K. *İmmünoloji 2000: Sitokinler*. Güneş & Nobel Tıp Kitapevi Bursa 2000; 187-99.
90. Daig R, Andus T, Aschenbrenner E, Falk W, Scholmerich J, Gross V et al. Increased interleukin 8 expression in the colon mucosa in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1996; 38:216-22.
91. Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM. The platelet activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Crit Care Med* 2002; 30:S294-301.
92. Sun XM, Hsueh W. Bowel necrosis induced by tumor necrosis factor in rats is mediated by platelet activating factor. *J Clin Invest* 1988; 81:1328-31.

93. Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA et al. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1 beta synthesis. *J Cell Biol* 2001; 154:485-90.
94. Wang H, Tan X, Chaug H, Gonzalez-Crussi F, Remick DG, Hsueh W. Regulation of platelet activating factor receptor gene expression in vivo by endotoxin, platelet activating factor, and endogenous tumor necrosis factor. *Biochem J* 1997; 322:603-8.
95. Caplan MS, Sun XM, Hsueh W, Hageman JR. Role of platelet activating factor and tumor necrosis factor-alpha in neonatal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1990; 116:960-4.
96. Moya FR, Eguchi H, Zhao B, Furukawa M, Sfeir J, Osorio M. Platelet-activating factor acetylhydrolase in term and preterm human milk: a preliminary report. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1994;19:236-9.
97. Old LJ. Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 1985 8;230:630-2.
98. Swardfager W, Lanctôt K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 2010 ;68:930-41.
99. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2011; 104:487-501.
100. Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK et al. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry* 2010; 67:446-57.
101. Brynskov J, Foegh P, Pedersen G, Ellervik C, Kirkegaard T, Bingham A. Tumour necrosis factor alpha converting enzyme (TACE) activity in the colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2002; 51:37-43.
102. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003; 10:45-65.
103. Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002; 296:1634-5.
104. Gaur U, Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol* 2003; 66:1403-8.
105. Palladino MA, Bahjat FR. Anti-TNF- α therapies: the next generation. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2:736-46.

106. Markel TA, Crisostomo PR, Wairiuko GM, Pitcher J, Tsai BM, Meldrum DR. Cytokines in necrotizing enterocolitis. *Shock* 2006; 25:329-37.
107. Emami CN, Chokshi N, Wang J, Hunter C, Guner Y, Goth K. Role of interleukin-10 in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Am J Surg.* 2012; 203:428-35.
108. Lane JS, Todd KE, Lewis MP. Interleukin-10 reduces the systemic inflammatory response in a murine model of intestinal ischemia/reperfusion. *Surgery* 1997; 122:288-94.
109. Pender SLF, Breese EJ, Gunther U, Howie D, Wathen NC, Schuppan D et al. Suppression of T cell mediated injury in human gut by interleukin 10: role of matrix metalloproteinases. *Gastroenterol* 1998; 115:573-83.
110. Iglarz M, Schiffrin EL. Role of endothelin-1 in hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2003; 5:144-8.
111. George EM, Granger JP. Endothelin: Key Mediator of Hypertension in Preeclampsia. *Am J Hypertens* 2011; 24:964-9.
112. Danese S, Sans M, de la Motte C. Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2006; 130:2060-73.
113. Deng X, Szabo S, Khomenko T. Novel pharmacologic approaches to the prevention and treatment of ulcerative colitis. *Curr Pharm Des* 2013; 19:17-28.
114. Weil BR, Markel TA, Herrmann JL. Mesenchymal stem cells enhance the viability and proliferation of human fetal intestinal epithelial cells following hypoxic injury via paracrine mechanisms. *Surgery* 2009; 146:190-7.
115. Carlson BM. Embryology in the medical curriculum. *Anat Rec* 2002; 269:89-98.
116. Barrett KE. Epithelial biology in the gastrointestinal system: insights into normal physiology and disease pathogenesis. *J Physiol* 2012; 590:419-20.
117. Bissonnette B, Benson LN. Closure of persistently patent arterial duct and its impact on cerebral circulatory haemodynamics in children. *Can J Anaesth.* 1998; 45:199-205.
118. Deeg KH, Gerstner R, Bundscherer F, Harai G, Singer H, Gutheil H. Doppler sonographic detection of reduced flow velocity in the celiac trunk of the newborn infant with patent ductus arteriosus Botalli compared to a healthy control group. *Monatsschr Kinderheilkd* 1987; 135:24-9.

119. Bennet L, Quaedackers JS, Gunn AJ, Rossenrode S, Heineman E. The effect of asphyxia on superior mesenteric artery blood flow in the premature sheep fetus. *J Pediatr Surg* 2000; 35:34-40.
120. Iannucci GJ, Oster ME, Mahle WT. Necrotising enterocolitis in infants with congenital heart disease: the role of enteral feeds. *Cardiol Young* 2012; 2:1-7.
121. De La Torre CA, Miguel M, Martínez L, Aguilar R, Barrena S, Lassaletta L et al. The risk of necrotizing enterocolitis in newborns with congenital heart disease. a single institution-cohort study. *Cir Pediatr* 2010; 23:103-6.
122. Hasibeder W. Gastrointestinal microcirculation: Still a mystery? *Br J Anaesth* 2010; 105:393-6.
123. Vollmar B, Menger MD. Intestinal ischemia/reperfusion: Microcirculatory pathology and functional consequences. *Langenbecks Arch Surg* 2011; 396:13-29.
124. Ballance WA, Dahms BB, Shenker N, Kliegman RM. Pathology of neonatal necrotizing enterocolitis:a ten-year experience. *J Pediatr* 1990; 117:S6-13.
125. McElroy SJ, Underwood MA, Sherman MP. Paneth Cells and Necrotizing Enterocolitis: A Novel Hypothesis for Disease Pathogenesis. *Neonatology* 2013; 103:10-20.
126. Singh R, Shah BL. Necrotizing enterocolitis and the role of anemia of prematurity. *Semin Perinatol* 2012; 36:277-82.
127. Schreml S, Szeimies RM, Prantl L. Oxygen in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol* 2010; 163:257-68.
128. Reber KM, Nankervis CA, Nowicki PT. Newborn intestinal circulation. Physiology and pathophysiology. *Clin Perinatol* 2002; 29:23-9.
129. LeBlanc MH, D'Cruz C, Pate K. Necrotizing enterocolitis can be caused by polycythemic hyperviscosity in the newborn dog. *J Pediatr* 1984; 105:804-9.
130. Dunn SP, Gross KR, Scherer LR, Moenning S, Desanto A, Grosfeld JL. The effect of polycythemia and hyperviscosity on bowel ischemia. *J Pediatr Surg* 1985; 20:324-7.
131. Rüegger C, Hegglin M, Adams M, Bucher HU. Population based trends in mortality, morbidity and treatment for very preterm and very low birth weight infants over 12 years. *BMC Pediatr* 2012;22:12-7.

132. Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırması 2003, Hacettepe Üniversitesi Nüfus Etüpleri Enstitüsü, Sağlık Bakanlığı AnaÇocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Genel Müdürlüğü, Devlet Planlama Teşkilatı, Avrupa Birliği, Ekim 2004
133. Isayama T, Lee SK, Mori R, Kusuda S, Fujimura M, Ye XY, Shah PS et al. Comparison of mortality and morbidity of very low birth weight infants between Canada and Japan.; Canadian Neonatal Network; Neonatal Research Network of Japan. *Pediatrics* 2012; 130:e957-65.
134. Türk Neonatoloji Derneği Bülteni. Türkiye’de yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde mortalite 2005. 2006; 4:10-4.
135. Gomella T, Cunningham M, Eyal F. *Neonatology: Management, Procedures, On-Call Problems, Diseases, and Drugs*. McGraw-Hill Professional; 6 edition 2009;590-5.
136. Pearson F, Johnson MJ, Leaf AA. Milk osmolality: does it matter? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2013; 98:F166-9.
137. Henderson G, Anthony MY, McGuire W. Formula milk versus maternal breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; 4: CD002972.
138. Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl* 2003; 91:48-55.
139. Isolauri E, Salminen S. Probiotics, gut inflammation and barrier function. *Gastroenterol Clin North Am* 2005; 34:437-50.
140. Bolisetty S, Lui K, Oei J, Wojtulewicz J. A regional study of underlying congenital diseases in term neonates with necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr* 2000; 89:1226-30.
141. Ryder RW, Shelton JD, Guinan ME. Necrotizing enterocolitis: a prospective multicenter investigation. *Am J Epidemiol* 1980; 112:113-23.
142. Kanto WP Jr, Hunter JE, Stoll BJ. Recognition and medical management of necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol* 1994; 21:335-46.
143. Hunter CJ, Podd B, Ford HR, Camerini V. Evidence vs experience in neonatal practices in necrotizing enterocolitis. *J Perinatol* 2008; 28:S9-S13.
144. Tatekawa Y, Muraji T, Imai Y, Nishijima E, Tsugawa C. The mechanism of focal intestinal perforations in neonates with low birth weight. *Pediatr Surg Int* 1999; 15:549-52.

145. Halliday HL, Ehrenkranz RA, Doyle LW. Early postnatal (<96 h) corticosteroids for preventing chronic lung disease in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 1998; 3:CD001146.
146. Okuyama H, Kubota A, Oue T, Kuroda S, Ikegami R, Kamiyama M et al. A comparison of the clinical presentation and outcome of focal intestinal perforation and necrotizing enterocolitis in very-low-birth-weight neonates. *Pediatr Surg Int* 2002; 18:704-6.
147. Tanriverdi S, Koroglu O, Uygur O, Celik A, Dulger F, Yalaz M. Serial Intravesical Pressure Measurements Can Predict the Presence and the Severity of Necrotizing Enterocolitis. *Eur J Pediatr Surg* 2012 Nov 19.
148. Ladd AP, Rescorla FJ, West KW, Scherer LR, Engum SA, Grosfeld JL. Long-term follow-up after bowel resection for necrotizing enterocolitis: factors affecting outcome. *J Pediatr Surg* 1998; 33:967-72.
149. Aydemir G, Cekmez F, Tanju IA. Increased fecal calprotectin in preterm infants with necrotizing enterocolitis. *Clin Lab* 2012; 58:841-4.
150. Smith B, Bodé S, Petersen BL, Jensen TK, Pipper C. Community analysis of bacteria colonizing intestinal tissue of neonates with necrotizing enterocolitis. *BMC Microbiol* 2011; 11:73.
151. Pierro A. The surgical management of necrotising enterocolitis, *Early Hum Dev* 2005; 81:79-85.
152. Oygür N. Nekrotizan Enterokolit. Yurdakök M, Erdem G. *Neonatoloji*. 2.Baskı. Alp Ofset I. 2004; 552-6.
153. Quigley MA, Henderson G, Anthony MY, McGuire W. Formula milk versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; 4:CD002971.
154. Lucas A, Cole TJ. Breast milk and neonatal necrotizing enterocolitis. *Lancet* 1990; 336:1519-23.
155. Patole SK, de Clerk N. Impact of standardized feeding regimens on incidence of neonatal necrotizing enterocolitis: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2005; 90:F147-51.
156. Berseth CL, Bisquera JA, Paje VU. Prolonging small feeding volumes early in life decreases the incidence of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics* 2003; 111:529-34.

157. Premji S, Chessell L. Continuous nasogastric milk feeding versus intermittent bolus milk feeding for premature infants less than 1500 grams. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; (11):CD001819.
158. Kennedy KA, Tyson JE. Rapid versus slow rate of advancement of feedings for promoting growth and preventing necrotizing enterocolitis in parenterally fed low-birth-weight infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;(2):CD001241.
159. Burgio GR, Lanzavecchia A, Plebani A. Ontogeny of secretory immunity: levels of secretory IgA and natural antibodies in saliva. *Pediatr Res* 1980; 14:1111-4.
160. Fast CH, Rosegger H. Necrotizing enterocolitis prophylaxis: oral antibiotics and lyophilized enterobacteria vs oral immunoglobulins. *Acta Paediatr Suppl* 1994; 396:86-90.
161. Foster JP, Cole MJ. Oral immunoglobulin for preventing necrotizing enterocolitis in preterm and low birth weight neonates. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; 1: CD001816.
162. Patel BK, Shah JS. Necrotizing Enterocolitis in Very Low BirthWeight Infants: A Systemic Review. *ISRN Gastroenterol* 2012;2012:562594.
163. Mohan P, Abrams SA. Oral lactoferrin for the treatment of sepsis and necrotizing enterocolitis in neonates. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; 1:CD007138.
164. Manzoni P, Rinaldi M, Cattani S, Pagni L, Romeo MG, Messner H et al. Bovine lactoferrin supplementation for prevention of late-onset sepsis in very low-birth-weight neonates: a randomized trial. *JAMA* 2009; 302:1421-8.
165. Amin HJ, Zamora SA, McMillan DD, Fick GH. Arginine supplementation prevents necrotizing enterocolitis in the premature infant. *J Pediatr* 2002; 140:425-31.
166. Lee JH. An update on necrotizing enterocolitis: pathogenesis and preventive strategies. *Korean J Pediatr* 2011; 54:368-72.
167. Poindexter BB, Ehrenkranz RA, Stoll BJ. Parenteral glutamine supplementation does not reduce the risk of mortality or late onset sepsis in extremely low birth weight infants. *J Pediatr* 2004; 113:1209-15.
168. Coursodon-Boydiddle CF, Snarrenberg CL, Adkins-Rieck CK. Pomegranate seed oil reduces intestinal damage in a rat model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; 303:G744-51.

169. Lin HC, Su BH, Chen AC. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics* 2005; 115:1-4.
170. Siu YK, Ng PC, Fung SC, Lee CH, Wong MY, Fok TF et al. Double blind, randomised, placebo controlled study of oral vancomycin in prevention of necrotising enterocolitis in preterm, very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1998; 79:F105-9.
171. Boo NY, Cheah GS. Risk factors associated with necrotising enterocolitis in very low birth weight infants in Malaysian neonatal intensive care units. *Singapore Med J* 2012; 53:826-31.
172. Jiang P, Jensen ML, Cilieborg MS, Thymann T, Wan JM, Sit WH et al. Antibiotics Increase Gut Metabolism and Antioxidant Proteins and Decrease Acute Phase Response and Necrotizing Enterocolitis in Preterm Neonates. *PLoS One*. 2012; 7:e44929.
173. Crowley P, Chalmers I, Keirse MJ. The effects of corticosteroid administration before preterm delivery: an overview of the evidence from controlled trials. *Br J Obstet Gynaecol* 1990; 97:11-25.
174. Musemeche CA, Baker JL, Feddersen RM. A model of intestinal ischemia in the neonatal rat utilizing superior mesenteric artery occlusion and intraluminal platelet-activating factor. *J Surg Res* 1995; 58:724-7.
175. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animals and tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95:351-8.
176. Pleban PA, Munyani A, Beachum J. Determination of selenium concentration and glutathione peroxidase activity in plasma and erythrocytes. *Clin Chem* 1982; 28:311-6.
177. Beutler E. Red cell metabolism. (1975) In: *A manual of biochemical methods*. Beutler E (ed), s. 67-69, Grunef and Strottan, New York.
178. Fridovich I. Superoxide dismutase. *Advances in Enzymology* 1974; 41:35-97.
179. Neu J. Necrotizing enterocolitis: the search for a unifying pathogenic theory leading to prevention. *Pediatr Clin North Am* 1996; 43:409-32.
180. Morecroft JA, Spitz L, Hamilton PA, Holmes SJ. Necrotizing enterocolitis multisystem organ failure of the newborn? *Acta Paediatr Suppl* 1994; 396:21-3.

181. Albanese CT, Rowe MI. Necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 1995; 4:200-6.
182. Tian R, Liu SX, Williams C, Soltau TD, Dimmitt R, Zheng X et al. Characterization of a necrotizing enterocolitis model in newborn mice. *Int J Clin Exp Med* 2010; 3:293-302.
183. Papparella A, DeLuca FG, Oyer CE, Pinar H, Stonestreet BS. Ischemia-reperfusion injury in the intestines of newborn pigs. *Pediatr Res* 1997;42(2):180-8.
184. Barlow B, Santulli TV. Importance of multiple episodes of hypoxia or cold stress on the development of enterocolitis in an animal model. *Surgery* 1975; 77:687-90.
185. Zuckerbraun BS, Otterbein LE, Boyle P, Jaffe R, Upperman J, Zamora R. Carbon monoxide protects against the development of experimental necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289:G607-13.
186. Caplan MS, Hedlund E, Adler L, Hsueh W. Role of asphyxia and feeding in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *Pediatr Pathol* 1994; 14:1017-28.
187. Temiz A, Salman T, Kapran Y. Deneysel yenidoğan nekrotizan enterokolit modelinde stabil prostasiklin analogu olan iloprost'un etkisi. *Çocuk Cerrahisi Dergisi* 2009; 23:52-7.
188. Kumral A, Yeşilirmak DC, Tuygan K. Activated protein C reduces intestinal injury in an experimental model of necrotizing enterocolitis. *Journal of Pediatric Surgery* 2010; 45:483-9.
189. Dvorak B, Halpern MD, Holubec H, Williams CS, McWilliam DL, Dominguez JA. Epidermal growth factor reduces the development of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282:G156-64.
190. Ran-Ressler RR, Khailova L, Arganbright KM, Adkins-Rieck CK, Jouni ZE, Koren O et al. Branched chain fatty acids reduce the incidence of necrotizing enterocolitis and alter gastrointestinal microbial ecology in a neonatal rat model. *PLoS One* 2011; 6:e29032.
191. Bjornvad CR, Thymann T, Deutz NE, Burrin DG, Jensen SK, Jensen BB et al. Enteral feeding induces diet dependent mucosal dysfunction, bacterial

- proliferation, and necrotizing enterocolitis in preterm pigs on parenteral nutrition. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295:G1092-103.
192. Halpern MD, Khailova L, Molla-Hosseini D, Arganbright K, Reynolds C, Yajima M. Decreased development of necrotizing enterocolitis in IL-18 deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294:G20-6.
193. Hoshiba J. Method for hand-feeding mouse pups with nursing bottles. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2004; 43:50-3.
194. Agnello E, Malfi G, Costantino AM, Massarenti P, Pugliese M, Fortunati N. Tumour necrosis factor alpha and oxidative stress as maintaining factors in the evolution of anorexia nervosa. *Eat Weight Disord* 2012 ;17:e194-9.
195. Tan X, Hsueh W, Gonzalez-Crussi F. Cellular localization of tumor necrosis factor (TNF)-alpha transcripts in normal bowel and in necrotizing enterocolitis. TNF gene expression by Paneth cells, intestinal eosinophils, and macrophages. *Am J Pathol* 1993; 142:1858-65.
196. Szalagatys-Sidorkiewicz A, Zagierski M, Renke J, Korzon M. Antioxidative properties of human milk. *Med Wieku Rozwoj* 2004; 8:353-8.
197. Garofalo R, Chheda S, Mei F. Interleukin-10 in human milk. *Pediatr Res* 1995; 37:444-9.
198. Edelson MB, Bagwell CE, Rozycki HJ. Circulating pro- and counterinflammatory cytokine levels and severity in necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* 1999; 103:766-71.
199. Nadler EP, Stanford A, Zhang XR, Schall LC, Alber SM, Watkins SC et al. Intestinal cytokine gene expression in infants with acute necrotizing enterocolitis: interleukin-11 mRNA expression inversely correlates with extent of disease. *J Pediatr Surg* 2001; 36:1122-9.
200. Viscardi RM, Lyon NH, Sun CC, Hebel JR, Hasday JD. Inflammatory cytokine mRNAs in surgical specimens of necrotizing enterocolitis and normal newborn intestine. *Pediatr Pathol Lab Med* 1997; 17:547-59.
201. Benkoe T, Reck C, Gleiss A, Kettner S, Repa A, Horcher E et al. Interleukin 8 correlates with intestinal involvement in surgically treated infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2012; 47:1548-54.

202. Jilling T, Simon D, Lu Meng FJ, Li D, Schy R, Thomson RB et al. The roles of bacteria and TLR4 in rat and murine models of necrotizing enterocolitis. *J Immunol* 2006; 177:3273-82.
203. Danese S, Sans M, de la Motte C. Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2006; 130:2060-73.
204. Ozgurtas T, Aydin I, Turan O, Koc E, Hirfanoglu IM, Acikel CH et al. Vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor levels in human milk of mothers with term and preterm neonates. *Cytokine* 2010; 50:192-4.
205. Loui A, Eilers E, Strauss E, Pohl-Schickinger A, Obladen M, Koehne P. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) levels in early and mature human milk from mothers of preterm versus term infants. *J Hum Lact* 2012; 28:522-8.
206. Patki S, Patki U, Patil R, Indumathi S, Kaingade P, Bulbule A et al. Comparison of the levels of the growth factors in umbilical cord serum and human milk and its clinical significance. *Cytokine* 2012; 59:305-8.
207. Michalski Ł, Kleniewska P, Piechota-Polańczyk A, Gorąca A. The role of endothelin-1 and its receptor blockers on the liver function. *Gen Physiol Biophys* 2012; 31:383-8.
208. Agapitov AV, Haynes WG. Role of endothelin in cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2002; 3:1-15.
209. Ito Y, Doelle SM, Clark JA, Halpern MD, McCuskey RS, Dvorak B. Intestinal microcirculatory dysfunction during the development of experimental necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res* 2007; 61:180-4.
210. Nowicki PT, Dunaway DJ, Nankervis CA. Endothelin-1 in human intestine resected for necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 2005; 146:805-10.
211. Venkateswaran L, Wilimas JA, Dancy R, Wang WC, Korones S, Hayden J. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the treatment of neonates with neutropenia and sepsis. *Pediatr Hematol Oncol* 2000; 17:469-73.
212. Egea L, Hirata Y, Kagnoff MF. GM-CSF: a role in immune and inflammatory reactions in the intestine. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 4:723-31.
213. Matés JM, Pérez-Gómez C, Blanca M. Chemical and biological activity of free radical 'scavengers' in allergic diseases. *Clin Chim Acta* 2000; 296:1-15.

214. Mulvihill SJ, Stone MM, Fonkalsrud EW, Debas HT. Trophic effect of amniotic fluid on fetal gastrointestinal development. *J Surg Res* 1986; 40:291-6.
215. Trahair JF, Sangild PT. Fetal organ growth in response to oesophageal infusion of amniotic fluid, colostrum, milk or gastrin-releasing peptide: a study in fetal sheep. *Reprod Fertil Dev* 2000; 12:87-95.
216. Hirai C, Ichiba H, Saito M, Shintaku H, Yamano T, Kusuda S. Trophic effect of multiple growth factors in amniotic fluid or human milk on cultured human fetal small intestinal cells. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002; 34:524-8.
217. Wu G, Bazer FW, Hu J, Johnson GA, Spencer TE. Polyamine synthesis from proline in the developing porcine placenta. *Biol Reprod* 2005; 72:842-50.
218. Kwon H, Wu G, Bazer FW, Spencer TE. Developmental changes in polyamine levels and synthesis in the ovine conceptus. *Biol Reprod* 2003; 69:1626-34.
219. Bogavac M, Lakic N, Simin N, Nikolic A, Sudji J, Bozin B. Biomarkers of oxidative stress in amniotic fluid and complications in pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25:104-8.
220. Vural M, Camuzcuoglu H, Toy H, Aksoy N. Amniotic fluid prolidase activity and oxidative status in neural tube defects. *Fetal Diagn Ther* 2010; 28:34-9.
221. Tranquilli AL, Giannubilo SR, Bezzeccheri V, Ciavattini A, Scagnoli C, Mazzanti L. Amniotic levels of nitric oxide and vascular endothelial growth factor in pregnancy with subsequent intrauterine fetal death. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 114:162-5.
222. Sun WM, Penagini R, Hebbard G, Malbert C, Jones KL, Emery S et al. Effect of drink temperature on antropyloroduodenal motility and gastric electrical activity in humans. *Gut* 1995; 37:329-34.
223. Stavchansky S, Tung IL. Effect of hypothermia on the intestinal absorption of uracil and L-dopa in the rat. *J Pharm Sci* 1987; 76:688-91.
224. Prentice A. Handbook of milk composition. Ed: Jensen RG. Regional variations in the composition of human milk. New York (NY). Academic Press 1995; 115-221.
225. Subeq YM, Hsu BG, Lin NT, Yang FL, Chao YF, Peng TC et al. Hypothermia caused by slow and limited-volume fluid resuscitation decreases organ damage by hemorrhagic shock. *Cytokine* 2012; 60:68-75.
226. Sheldon I, Freedman SI, Ang EP, Toot PJ. Meconium Granulomas or Vernix-Induced Peritonitis. *JAMA* 1986; 255:906.

227. Erstad BL. Osmolality and osmolarity: narrowing the terminology gap. *Pharmacotherapy* 2003; 23:1085-6.
228. Seidl H, Schmidt T, Gundling F, Pfeiffer A. The effect of osmolarity and caloric load on small bowel motility. *Neurogastroenterol Motil* 2013; 25:e11-6.
229. Hubbell MC, Semotiuk AJ, Thorpe RB, Adeoye OO, Butler SM, Williams JM et al. Chronic hypoxia and VEGF differentially modulate abundance and organization of myosin heavy chain isoforms in fetal and adult ovine arteries. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012; 303:C1090-103.
230. Apple FS, Wu AH, Mair J, Ravkilde J, Panteghini M, Tate J. Future biomarkers for detection of ischemia and risk stratification in acute coronary syndrome. *Clin Chem* 2005; 51:810-24.
231. Won JH, Ji JE, Ahn KH, Kim SK, Choi JM, Ha HC et al. Effect of rice cell-derived human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on 5-Fluorouracil-induced mucositis in hamsters. *Biol Pharm Bull* 2013; 36:425-31.
232. Egea L, McAllister CS, Lakhdari O, Minev I, Shenouda S, Kagnoff MF. GM-CSF Produced by Nonhematopoietic Cells Is Required for Early Epithelial Cell Proliferation and Repair of Injured Colonic Mucosa. *J Immunol* 2013; 190:1702-13.

T.C.
KAHRAMANMARAS SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BASKANLIĞI

ARAŞTIRMA BAŞVURU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	Araştırmanın Başlığı	"Deneysel Nekrotizan Enterokolit Modelinde Arınos Sıvısı ve Sitokinlerin Nekrotizan Enterokolit ile İlişkisi"
	Başvuru Tarihi	16.03.2012
	Protokol No	17

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Bege Adı	Dili
	Başvuru Formu	Türkiye

KARAR BİLGİLERİ	Oturum No: 2012/03	Karar No: 9	Tarihi: 20.03.2012
	Doç. Dr. Şeref ÖLĞAR'ın sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvurusu üzerine ilgili belgeler araştırmanın gerekeceği amaç, yöntem ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.		

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	KSÜ TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU YÖNERGESİ

Unvanı /Adı/Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Doç. Dr. Harun ÇİRALİK Başkan	Tıbbi Patoloji	K.S.Ü. Tıp Fakültesi	VE OH	OE ✓ H	ARAŞTIRMACI
Prof. Dr. Durmuş DEVECİ Üye	Fizyoloji	K.S.Ü. Tıp Fakültesi	OE ✓ H	OE ✓ H	KATILMADI
Doç. Dr. Fatma NANCİ TOLUN Üye	Tıbbi Biyokimya	K.S.Ü. Tıp Fakültesi	OE ✓ H	VE OH	
Doç. Dr. Yusuf KRİSTİN Üye	Tıbbi Farmakoloji	K.S.Ü. Tıp Fakültesi	OE ✓ H	VE OH	
Doç. Dr. Davut ÖZBAĞ Üye	Anatomi	K.S.Ü. Tıp Fakültesi	OE ✓ H	VE OH	
Yrd. Doç. Dr. Bilal ALTUNOLUK Üye	Üroloji	K.S.Ü. Tıp Fakültesi	VE OH	OE ✓ H	ARAŞTIRMACI
Yrd. Doç. Dr. Ali Nihat KALENDER Üye	Ortopedi ve Travmatoloji	K.S.Ü. Tıp Fakültesi	OE ✓ H	VE OH	
Adem GÖKKAYA Üye	Diş Hekimi	Serbest	OE ✓ H	VE OH	
Erdem HİTİK YULMAÇAN Üye	Avukat	Serbest	OE ✓ H	VE OH	
ŞERH (VARSA)					

*Araştırma ile ilgili
**Katılımda bulunma

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Version Numarası	Dil			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	29.05.2012		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ KONTROL ÖLÇÜ FORMU	01.06.2012		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>		
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama					
	TORANÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>					
	SKORİTA	<input type="checkbox"/>					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>					
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>					
	HASTA KARTI GÜVENCELERİ	<input type="checkbox"/>					
	İLAK	<input type="checkbox"/>					
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>					
SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>						
GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>						
Diğer:	<input type="checkbox"/>						
KARAR BELGELERİ	Karar No: 2012/11-03	Tarih: 06/05/2012					
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın güvenli, yarar, yararlı ve yararlı olduğu hakkında alınmış bilimsel ve etik kurulların görüşleri doğrultusunda değerlendirilmiştir. Etik ve bilimsel sınırların korunması amacıyla toplantıya katılan Etik Kurul üyeleri oy birliği ile karar vermiştir.						

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Yönetmeliği

BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI Prof. Dr. Metin KILINÇ

Unvanı/Adı/Soyadı	Unvanı/A. Alanı	Bölümü	Cinsiyet		Araştırma ile ilgili		Katkısı *		İmza
Prof. Dr. Metin KILINÇ Başkan	Tıbbi Biyokimya	KSD Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Hasan Çetin ERENBERBER Üye	Haftık Sağlığı	KSD Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Mustafa GÜL Üye	Tıbbi Mikrobiyoloji	KSD Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	ARAŞTIRMACI
Doç. Dr. Harun ÇEKALIK Üye	Tıbbi Fizyoloji	KSD Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	ARAŞTIRMACI
Doç. Dr. Yusuf ERGÜN Üye	Tıbbi Farmakoloji	KSD Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	İZİNLI
Doç. Dr. Tuhaş MERT Üye	Biyofizik	KSD Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Mehmet DAVU TOĞULU Üye	Çocuk Sağ. ve Hast.	KSD Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Mehmet BENOĞLU Üye	Anest. ve Rea.	KSD Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Çiğdem ACAR Üye	Kardiyoloji	KSD Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	İZİNLI
Doç. Dr. Vedat BAKAN Üye	Çocuk Cerrahisi	KSD Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	KATILMADI
Yrd. Doç. Dr. Kerem AKKARŞİL Üye	Adli Tıp	KSD Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Mehmet Emin BARENDELI Üye	Avukat	Serbest	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Mehmet CANBAHAN Üye	Zincirli Mühendis	İl Çiğde, Tarih ve Hay. Bilim.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yasemin YILMAZ Üye	Öğretmen	Özel Adli KENÇER Anadolu Lisesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* : Toplantıda Ele Alınmıştır

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU BİLGİLENDİRİLMİŞ
GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Bu katıldığınız çalışma bilimsel bir araştırma olup araştırmanın adı "**DENEYSEL NEKROTİZAN ENTEROKOLİT MODELİNDE AMNİOS SIVISI VE SİTOKİNLERİN NEKROTİZAN ENTEROKOLİT İLE İLİŞKİSİ**" dir.

Bu çalışmanın amacı yenidoğan bebeklerde ciddi bir mide-bağırsak sistemi hastalığı olan "nekrotizan enterokolit" hastalığının fareler üzerinde oluşturulmuş deneysel modelinde deneklere verilecek amnion sıvısının hastalığın şiddeti ve seyrine etkilerinin araştırılmasıdır.

Araştırma yaklaşık 6 ay sürecektir.

Bu çalışmada sizin için herhangi bir risk ve zarar söz konusu değildir. Çalışma kapsamında sezaryen yöntemi ile yaptığımız doğum sırasında bebekle birlikte rahimden çıkan amnion sıvısı ismi verilen sıvıdan örnek alınacaktır. Bu sizin veya bebeğinizin sağlığını iyi ya da kötü yönde etkileyecek bir uygulama değildir.

Bu çalışmada yer almanız sebebiyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır. Sizden ücret de alınmayacaktır.

Bu çalışmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır, çalışmada yer almayı reddedebilirsiniz, ya da herhangi bir aşamada çalışmadan ayrılabilirsiniz. Bu durum herhangi bir cezaya ya da sizin yararınıza engel duruma yol açmayacaktır ve tıbbi bakımınızı etkilemeyecektir. Çalışma ile ilgili olarak günün 24 saatinde 0532 460 46 65 nolu telefondan Dr Muhammed ÜDÖRGÜCÜ ile iletişime geçebilirsiniz.

Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır, çalışmadan çekilmeniz ya da araştırıcı tarafından çıkarılmamız durumunda sizinle ilgili tıbbi veriler gerekirse bilimsel amaçlı kullanılabilir. Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır.

Bu çalışmaya katılmak istediğiniz takdirde formun alt kısmında bulunan "gönüllü beyanı" kısmına kendi el yazınız ile isteğinizi yazıp imzalıyorsunuz.

Gönüllünün Beyanı: (Kendi El Yazısı İle)

Gönüllünün Adı Soyadı Tarih: İmzası:	Olur İşlemine Tanık Olan Kişinin Adı Soyadı Tarih: İmzası:	Araştırma Ekibinde Yer Alan Yetkin Bir Araştırmacının Adı Soyadı: Doç Dr Şeref OLGAR Tarih:01 06 2012 İmza: 
---	---	---