

.T.C.
Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı
Neonatoloji Bilim Dalı

**DENEYSEL NEKROTİZAN ENTEROKOLİT MODELİNDE PLASMİDLERE
KLONLANMIŞ VASKULER ENDOTELYAL BÜYÜME FAKTÖR GENİNİN
İYİLEŞME ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Hande Özgün KARATEPE
YAN DAL UZMANLIK TEZİ
(Deneysel Çalışma)

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Filiz Bakar

İSTANBUL 2011

TEŐEKKÜR

Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakóltesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Neonatoloji Bilim Dalı'nda geçen yan dal uzmanlık eğitimim süresince, eğitimimde büyük katkı ve emekleri geçen değerli hocam Doç. Dr. Filiz Bakar'a, yan dal eğitimimizin gerçekleşmesinde desteklerini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Ayça Vitrinel'e, eğitimim süresince mesleki bilgi ve deneyimimi artırmamda ilgi ve yardım gördüğüm Prof. Dr. Reha Cengizlier'e teőekkür ve saygılarımı sunarım.

Berber çalıőmaktan gurur ve mutluluk duyduğum sevgili çalışma arkadaşlarım Dr. Mustafa Berber, Dr. Ahmet Özen, Dr. Hülya Ercan, Dr. Mahir Gülcan, Dr. Suat Biçer, Dr. oőkun Saf, Dr. Pınar Ergenokon'a içten teőekkürlerimi sunarım.

Tez çalıőmam döneminde yardımlarından dolayı Doç Dr. Duran Üstek, Doç. Dr. Gökhan Adaő'a ayrıca teőekkür ederim.

Her zaman manevi desteklerini aldığım çok sevdiğim ailem, eőim ve biricik kızıma teőekkür ederim.

Dr. Hande Özgün Karatepe

ÖZET

Giriş: Nekrotizan enterokolit (NEK) yenidoğan döneminde mortalite ve morbiditeye neden olan önemli bir gastrointestinal acildir. Bu çalışmada amacımız plazmide klonlanmış insan VEGF-A geninin NEK oluşturulmuş yenidoğan ratlardaki etkinliğini araştırmaktır.

Metod: 24 vistar albino yenidoğan rat 3 gruba (n=8) ayrıldı. Grup 1 sham grubu, grup 2, NEK oluşturulduktan sonra sadece plasmid verilen grup, grup 3 NEK oluşturulduktan sonra VEGF geni ile tedavi edilen grup. NEK CO2 odasında asfiksi oluşturularak ve soğuk stres kullanılarak meydana getirildi. Tüm ratlar NEK oluşturulduktan sonra 4. gün sakrifiye edildi. Barsak dokusunda oksidatif hasar ve inflamatuvar parametreleri ve VEGF düzeyleri biokimyasal olarak çalışıldı. Histopatolojik olarak ise nekroz, epitelizasyon, inflamasyon parametreleri ve neovaskülarizasyon düzeyleri incelendi.

Bulgular: Kolon dokusunda MDA ve NO düzeyleri Grup 3'te (VEGF tedavi grubu) grup 2'ye göre (NEK grubu) anlamlı olarak farklı idi (P <0.05). Histopatolojik sonuçlar açısından da grup 3 grup 2'ye göre anlamlı olarak daha iyiydi.

Sonuç: VEGF gen tedavisi vaskülarizasyonu artırarak kolonik oksidatif hasarı azaltmaktadır. Bu tedavi gelecekte NEK' in erken döneminde etkin olarak kullanılabilir.

ABSTRACT

Background: Necrotizing enterocolitis (NEC) is the most common gastrointestinal emergency and the leading surgical cause of death in premature infants. The aim of this study is to apply human VEGF-A naked DNA-mediated gene therapy in order to search their effects in the healing process of necrotizing enterocolitis.

Methods: Twenty-four Wistar albino newborn rats were divided into three equal groups (n=8) as follows: Group-1: sham group; group-2: necrotizing enterocolitis+plasmid delivery; Group-3: necrotizing enterocolitis+ VEGF plasmid delivery. Wistar albino newborn rats were fed by hand and exposed to asphyxia by CO₂ chamber and cold stress to develop NEC. All of the rats were sacrificed in the postoperative 4th day. Tissue oxidative damage, inflammatory parameters and VEGF levels were determined by using biochemical methods. Necrosis, epithelialization, inflammatory processes, and neovascularization were studied histopathologically.

Results: The intestinal tissue levels of MDA and NO were significantly different between the VEGF therapy and control group (P <0.05). VEGF gene therapy significantly accelerated the healing process of histologic parameters included angiogenesis.

Conclusions: The results of the current study revealed that VEGF gene therapy improved vascularization and reduced intestinal injury by minimizing oxidative stress. This therapy can be effectively used in NEC in the future.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR.....	V
ŞEKİLLER.....	VI
TABLolar.....	VII
RESİMLER.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 NEKROTİZAN ENTEROKOLİT.....	3
2.1.1. Epidemiyoloji.....	3
2.1.2. Patogenez.....	5
2.1.2.1. Preterm doğum.....	6
2.1.2.2. Beslenme.....	11
2.1.2.3. Hipoksi-İskemi.....	13
2.1.2.4. Anormal bakteriyel kolonizasyon ve enfeksiyon.....	14
2.1.2.5. İlaçlar.....	16
2.1.2.6. Genetik.....	17
2.1.2.7. Vasoaktif ve enflamatuvar mediatörler.....	17
2.1.3 Histopatoloji.....	24
2.1.4 Tanı.....	24
2.1.4.1. Klinik Bulgular.....	24
2.1.4.2. Laboratuvar Bulguları.....	26
2.1.4.3. Radyolojik Bulgular.....	28
2.1.5. Tedavi.....	31
2.1.5.1. Medikal Tedavi.....	31
2.1.5.2. Cerrahi Tedavi.....	33
2.1.6. Prognoz.....	33
2.1.6.1. Koruyucu Önlemler.....	35
2.2. BÜYÜME FAKTÖRLERİ.....	39
2.2.1. Epidermal büyüme faktörü.....	40
2.2.2. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü.....	41
2.2.3. Fibroblastik büyüme faktörü.....	41
2.2.4. Vasküler endotelial büyüme faktörü.....	41

2.3.GEN TERAPİSİ.....	42
2.3.1.Genterapisi tipleri.....	43
2.3.1.1.Germ hücre gen terapisi.....	43
2.3.1.2.Somatik gen terapisi.....	43
2.3.2.Terapi metodları.....	44
2.3.3.Gen transferi yöntemleri.....	44
2.4. GEN TERAPİSİNDE VEKTÖRLER	44
2.4.1.Virüsler.....	44
2.4.1.1.Retrovirüsler.....	45
2.4.1.2.Lentiviral vektörler.....	47
2.4.1.3.Adenovirüsler.....	47
2.4.1.4.Adeno-ilişkili virüsler.....	48
2.4.1.5.Protein zarflı viral vektörlerin psödotiplendirilmesi.....	48
2.4.2.Viral Olmayan Metodlar.....	49
2.4.2.1.Çıplak DNA.....	49
2.4.2.2.Oligonükleotidler.....	49
2.4.2.3.Lipopleksler ve polipleksler.....	50
2.4.3.Plazmidler.....	50
3. MATERYAL METOD.....	51
3.1.Deney Hayvanları.....	51
3.2.Plazmid Hazırlanması.....	51
3.3.Cerrahi Teknik veTedavi.....	52
3.4. Histopatolojik İnceleme.....	54
3.5.Biyokimyasal İnceleme.....	56
3.6.İstatiksel Değerlendirme.....	57
4.BULGULAR.....	57
4.1.Doku VEGF ve VEGF Reseptör Düzeyi.....	57
4.2.Doku Oksidatif Hasar Parametreleri.....	58
4.3.Doku İnflamatuvar Parametreleri.....	59
4.4.Biyokimyasal Apoptozis Düzeyi Sonuçları.....	60
4.5.Histopatolojik Değerlendirme.....	61
5.TARTIŞMA.....	66
6. SONUÇLAR.....	72
7.KAYNAKLAR.....	73

KISALTMALAR

NEK	Nekrotizan enterokolit
YYBÜ	Yenidoğan yoğun bakım ünitesi
ÇDDA	Çok düşük doğum ağırlıklı
GIS	Gastrointestinal sistem
NO	Nitrik oksit
İUBG	İntrauterin büyüme geriliği
Ig	İmmünglobülin
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
FGF	Fibroblastic growth factor, fibroblastik büyüme faktörü
EGF	Epidermal growth factor, epidermal büyüme faktörü
PAF	Platelet aktive edici faktör
TNF-α	Tümör nekroz faktör-alfa
IL	İnterlökin
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
TLR	Toll-like receptor, toll-like reseptör
PDA	Patent duktus arteriyozus
PAF-AH	Platelet aktive edici faktör-asetilhidrolaz
DNA	Deoksi ribonükleik asit
LPS	Lipopolisakkarit
SCFA	Short chain fatty acid, kısa zincirli yağ asidi
LT	Lökotrien
MMP	Matriks metalloproteinazlar
TGF-β	Transforming growth factor beta, transforme edici büyüme faktörü beta
IGF	Insulin like growth factor, insulin benzeri büyüme faktörü
NOS	Nitrik oksit sentetaz
CRP	C-reaktif protein
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
E coli	Escherichia coli
EPO	Eritropoetin
RT	Revers transkriptaz
MDA	Malondialdehit dehidrogenaz
MPO	Miyeloperoksidaz

ŞEKİLLER

- Şekil 1:** NEK gelişiminde rol oynadığı düşünülen etiyolojik faktörler (Sayfa 6)
- Şekil 2:** Retrovirüs hayat siklusu (Sayfa 46)
- Şekil 3:** Viral gag, pro, pol ve env (paketleme) genleri ayrı moleküler yapı içerisinde tutulmakta ve sadece vektör paketlenmektedir (Sayfa 47)
- Şekil 4:** VEGF'ün plazmide klonlanma aşamasının şematik görünümü (Sayfa 52)
- Şekil 5:** Caspase 3 aktivitelerinin gruplara göre karşılaştırılması (Sayfa 61)
- Şekil 6:** Grupların histopatolojik inceleme sonuçları (Sayfa 63)

TABLULAR

- Tablo 1:** Nekrotizan Enterokolitte Modifiye Bell Evrelemesi (Sayfa 26)
- Tablo 2:** Grupların VEGF düzeylerinin ortalama ve standart sapmaları. (Sayfa 58)
- Tablo 3:** Grup 2 ve 3'ün VEGF düzeylerinin karşılaştırılması (Sayfa 58)
- Tablo 4:** Grupların oksidatif hasar parametrelerinin ortalama ve standart sapmaları (Sayfa 59)
- Tablo 5:** Grupların oksidatif hasar parametrelerinin karşılaştırılması (Sayfa 59)
- Tablo 6:** Grupların inflamatuvar parametrelerinin ortalama ve standart sapmaları (Sayfa 59)
- Tablo 7:** Grupların inflamatuvar parametrelerinin karşılaştırılması (Sayfa 60)
- Tablo 8:** Grupların caspase3 düzeylerinin ortalama ve standart sapmaları (Sayfa 60)
- Tablo 9:** Grupların caspase 3 düzeylerinin karşılaştırılması (Sayfa 60)
- Tablo 10:** Grupların histopatolojik karşılaştırma skorlaması (Sayfa 62)
- Tablo 11:** Grupların histopatolojik özelliklerinin karşılaştırılması (Sayfa 62)

RESİMLER

- Resim 1:** Yenidoğan ratların genel görünüşü (Sayfa 53)
- Resim 2:** CO2 inhalasyonu için dizayn edilmiş küvöz ve düzenek (Sayfa 54)
- Resim 3:** Cerrahi işlem sonrası yenidoğanın iç organlarının görünüşü (Sayfa 54)
- Resim 4:** Histopatolojik ve biyokimyasal inceleme için alınan ince barsağın görünümü, NEK oluşturulan segment görülmektedir (Sayfa 56)
- Resim 5:** Grup 1’de X100 büyütmede normal villüs yapısı (Sayfa 64)
- Resim 6:** Grup 2’de X100 büyütmede villüs yapısı (Sayfa 64)
- Resim 7:** Gen tedavisi yapılan grupta X100 büyütmede villüs yapısı (Sayfa 65)

1. GİRİŞ

Nekrotizan enterokolit (NEK) yenidoğanlarda en sık acil cerrahi girişim gerektiren, mukozadan başlayıp tüm katları tutabilen inflamasyon ve nekroz ile karakterize, gastrointestinal sistemin (GİS) ilerleyici bir hastalığıdır (1-3). Olguların %62-94'ünü prematüre bebekler oluşturur (1,4,5). Gebelik haftası ve doğum ağırlığı azaldıkça hastalığa yakalanma oranı artmaktadır (6). NEK sıklığı yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde %1-5 arasında değişmektedir (5,7). Hastalığın başlangıç zamanı genellikle postnatal 3-10. günler arasında olmakla birlikte, postnatal ilk 24 saatte veya 3.ayda bildirilen NEK olguları bulunmaktadır (8,9).

NEK'in kesin etyolojisi ve patogenezi tam olarak anlaşılmamış olmakla birlikte multifaktöriyel bir hastalık olduğu kabul edilmektedir (10). Prematüre doğumun yanı sıra hipoksik-iskemik hasar, formül mama ile beslenme ve patolojik bakterilerle kolonizasyon NEK oluşumunda etkili faktörlerdir (1,11). Gastrointestinal sistemde ilk mukozal hasarın intestinal iskemi sırasında olduğu ve bunun da bakteriyel invazyonu kolaylaştırdığı bilinmektedir (5,11). Prematüre bebekler yaşamlarının ilk günlerinde hipotansiyon, hipotermi, hipoksi, anemi, umbilikal kateterizasyon ve beslenme gibi bir çok strese maruz kalmaktadırlar (12,13). Bu stresler esnasında beyin ve kalp gibi yaşamsal organların kan akımları korunabilse de diğer organlarda ve mezenterik alanda iskemi meydana gelmektedir. Prematürelere barsak mukozası kan akımı ve oksijen değişimlerine oldukça duyarlı olduğundan kolayca mukozal hasar oluşmaktadır. Son yıllarda serbest oksijen radikallerinin de bu mukozal hasarı artırdığı gösterilmiştir (1,5). NEK'te barsakta hasar başladığı zaman beraberinde hücresel düzeyde iyileşme de başlamaktadır. Bu dönemde yara dokusunun merkezinde gelişen hipoksi, laktik asit ve yüksek miktarda oksidan madde birikimi anjiyogenetik faktörlerin salınımını tetikler. Yara onarımı için gerekli olan oksijen, besin ve inflamatuvar hücrelerin ulaştırılması için yeni damarların oluşumuna anjiyogenez denmektedir (14). Anjiyogenezi en fazla uyaran büyüme faktörü vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) dür (15). İnsan organizmasında anjiyogenez VEGF, fibroblastik büyüme faktörü (FGF) ve anjiyopoetinler gibi bir takım uyarıcı ve trombospondin, endostatin, anjiyostatin gibi bir takım inhibitor faktörler tarafından düzenlenir ve sınırlandırılır. VEGF moleküler ağırlığı 45-kd olan ve endotel hücreleri

üzerinde güçlü anjiyogenik mitojen etkisi gösteren, heparini bağlayan bir homodimerik glikoproteindir. İnsanda geni 6. kromozomun kısa kolunda bulunmaktadır. VEGF'ün A, B, C, D, E ve F olmak üzere 6 alt grubu vardır. VEGF A anjiyogenezin en önemli moleküler düzenleyicisidir. VEGF'in ayrıca endotel hücresi üzerinde anjiyogenezi uyarıcı, permeabilite artırıcı, antiapoptotik ve antiinflamatuvar etkileri de mevcuttur (16).

Klonlanmış büyüme faktör genlerinin çeşitli gen tedavi teknikleri kullanılarak hedef doku ve organlara verilmesi anjiyogenezin oluşturulması amaçlı yeni bir yaklaşımdır. VEGF geni ve proteini oldukça iyi çalışılmış bir anjiyogenetik faktördür. Çeşitli hayvan modellerinde, büyüme faktörlerinin dışarıdan verilmesi ile oluşturulan anjiyogenez çalışmaları oldukça umut vericidir. Gen tedavi çalışmaları henüz emekleme aşamasında olduğundan uygulanabilir standart protokol ve araçlar yoktur (17). Ökaryotik bir hücrede çalışacak bir plazmide hedef genin klonlanması ile DNA'nın hedef hücre, doku ve organa verilmesi gen tedavisinde kullanılan protokollerden biridir. Ancak, gen tedavisinde aşılması gereken alanlardan biri terapötik genin hedef doku ve organa verilme şeklidir. Plazmidler gen transfer ve tedavi çalışmalarında kullanılan en basit araçlardır, toksisitelerinin düşük olması, geçici ekspresyon sağlamaları ve kromozomal integrasyon özelliklerinin olmaması ile tıbbi çalışmalar için tercih edilirler (18).

Etyolojisi tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte iskemik hasara uğramış bir barsak zemininde geliştiği düşünülen NEK'te uygulanacak tedavi şekli halen tartışmalıdır. Genellikle mümkün olduğunca az girişimsel yöntemlerle ve az bağırsak kaybı ile hastanın içinde bulunduğu durumdan kurtarılıp aşamalı olarak tedavi edilmesi güncel tedavinin esasını oluşturmaktadır. Literatürde bu aşamalı yaklaşımlar sırasında barsakta kanlanmayı artırmak ve inflamasyonu azaltmak amacıyla çok çeşitli etkenler denenmiş fakat bu gün için kullanıma giren etkin bir ajan bulunamamıştır. Bu çalışma deneysel olarak oluşturulan NEK modelinde plazmide klonlanmış VEGF geninin barsaktaki oksidatif hasar ve anjiogenez üzerine etkilerini araştırmak amacı ile planlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 NEKROTİZAN ENTEROKOLİT

Yenidoğan döneminin önde gelen mortalite ve morbidite nedeni olan NEK, bu dönemde en sık rastlanılan gastrointestinal acildir. Patogenezi hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Medikal tedavi yetersiz kalabilir, cerrahi tedavi uygulanan olgularda morbidite ve mortalite yüksek olup ayrıca etkili koruyucu önlemler konusunda fikir birliğine varılamamıştır(1). NEK her ne kadar mideden anüse kadar gastrointestinal sistemi tutabilse de, daha çok distal ince barsak ve proksimal kolonu tutar, sınırlı mukozal harabiyetten total nekroza kadar değişen bir spektrum gösterir (2). Son 30 yıl içindeki bilgi birikimine ve yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde (YYBÜ) kullanılan tekniklerdeki ilerlemelere rağmen, NEK'in mortalitesi hala konjenital gastrointestinal anomalilerden daha yüksektir (3). Mortalite oranı %10-50 arasında değişmektedir ve pannekrozda oran daha da artmaktadır (3).

2.1.1. Epidemiyoloji

Demografik, klinik veya her iki alanda NEK gelişimine neden olabilen risk faktörlerini belirlemek için birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen preterm doğum ve düşük doğum ağırlığı NEK ile en fazla ilişkili bulunanlardır. Bu hastalığı geliştiren hastaların %90'ından fazlasında preterm doğum vardır ve NEK gelişme riski doğum ağırlığı ve gebelik yaşı ile ters orantılıdır. Doğum ve yenidoğan bakımındaki ilerlemeler, surfaktan tedavi uygulaması ve akciğer hastalıklarının tedavi oranı arttıkça daha fazla sayıda çok düşük doğum ağırlıklı (ÇDDA) yenidoğan hayatta kalmakta, bu da NEK riski altında olan topluluğun artmasına neden olmaktadır (1,4,5,19).

Nekrotizan enterokolitin gerçek görülme sıklığını tahmin etmek zordur (5). Sıklığı, ülkeden ülkeye, hastaneden hastaneye değişmektedir . Bunun nedenleri arasında; bölgelere göre farklılıklar olması, kurumlardaki kayıtların güvenilirliği, kurumlardaki uzmanların yaklaşım farklılıkları ve hastaya bağlı faktörler rol almaktadır (5,11). Tek tek merkezlerin NEK sıklıklarını rapor ettikleri birçok çalışma olmasına rağmen, çok merkezli yapılmış NEK sıklığına ait çalışma sayısı sınırlıdır. Bazı seçilmiş serilerde YYBÜ'e başvuran bebeklerde sıklık %1-5 ve 1000 canlı yenidoğanda 0,5-5 hasta

arasında değişmektedir (7). ÇDDA (<1500 gr) yenidoğanlarda bazı ülkelerdeki NEK insidansları: Japonyada % 1-2, Avusturya'da % 7, Yunanistan'da % 10, Arjantin'de % 14 ve Hong Kong'da % 28 olarak bildirilmiştir (3). Ülkemizde ise çok fazla sayıda araştırma olmamakla birlikte genel sıklık %0.19-7,2 prematüre yenidoğanlarda ise % 7,2-8,2 olarak bildirilmiştir (20).

NEK insidansı doğum ağırlığı ve gebelik yaşı ile ters orantılı olarak artmaktadır. Wilson ve arkadaşlarının 148 NEK'li hastayı değerlendirdikleri bir çalışmada bebeklerin % 42'sinin 1000 gramın altında, % 39'unun 1000–1500 gram arasında; %38'inin 1500-2000 gram arasında; % 0;11'inin 2500 gramın üstünde saptamışlardır (6). Gebelik haftası azaldıkça artan risk postkonsepsiyonel 36 haftaya kadar devam eder. Term bebeklerde NEK nadir görülür. Klinik ve patolojik bulgular preterm bebeklerdekine benzer olmakla birlikte genellikle altta yatan ve başlatıcı rol oynayan bir hastalık vardır (21,22). Perinatal asfiksi, polisitemi, solunum yetmezliği, myelomeningosel ve konjenital kalp hastalığı gibi konjenital anomaliler sıklıkla altta yatan nedenleri oluşturur (12,23)

Cinsiyet, NEK görülme oranlarını etkilemez ancak erkek bebeklerde ölüm riski artmıştır (24). Bazı çalışmalarda siyah ırkta beyazlara göre daha fazla oranda görüldüğü bildirilmekle birlikte, ırksal farklılık olmadığını gösteren çalışmalar da vardır. Sosyoekonomik durum ve mevsimlerle NEK gelişimi arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (7,25,26).

Hastalığın başlama zamanı postnatal birinci gün ile üçüncü ay arasında değişmekte olup sıklıkla ikinci haftadır. Ayrıca hastalığın ortaya çıkış zamanı, gebelik yaşı ve doğum ağırlığı ile ters orantılıdır; prematürelere daha matür bebeklere kıyasla, daha geç görülmektedir (8,9,3,27). Stoll ve arkadaşları çalışmalarında hastalığın başlangıç zamanını, 30 hafta veya daha küçük bebeklerde ortalama 20,2 gün olarak saptarken, 31–33 gebelik haftasında 13,8 gün, 34-36 gebelik haftasında 5,4 gün, 36 hafta ve üzeri bebeklerde ise 7 gün olarak saptamışlardır (19).

NEK'e bağlı mortalite hızı %15-30 arasında değişmektedir. Bazı çalışmalarda düşük doğum tartısı ve gebelik haftası ile ilişkili olarak daha yüksek mortalite oranları bildirilmiştir (24,28). NEK'li olguların çoğunda medikal tedavi yeterli olmakla birlikte vakaların %20-40'ında cerrahi girişim gerekmektedir (21,28). Cerrahi girişim uygulanan olgularda mortalite oranları %50'ye kadar yükselmektedir ve risk hastanın gebelik haftası

düştükçe artmaktadır. Cerrahi tedavi gerektiren yenidoğanların %25'inde ameliyat sonrası uzun dönemde yara dudaklarının ayrılması, karın içi abse ve bağırsak yapışıklıkları gibi komplikasyonlar görülmektedir (29). NEK nedeniyle cerrahi tedavi olmuş yenidoğanlarda en ciddi ve uzun süre devam eden sorun ise “kısa bağırsak sendromu’dur (30).

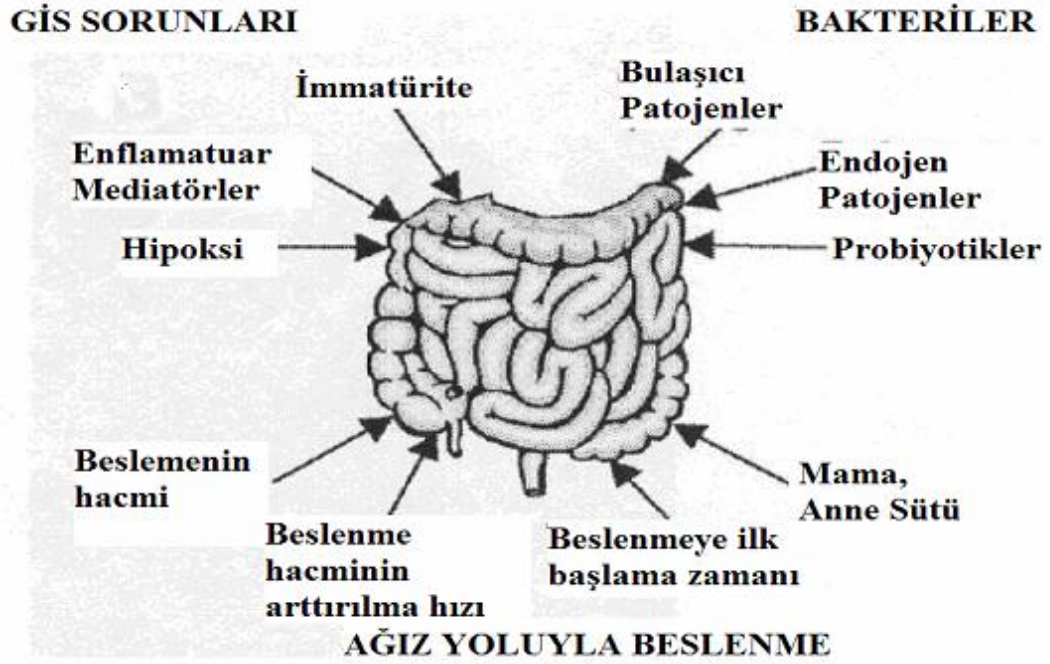
NEK olup iyileşen ÇDDA’lı yenidoğanlar, nörogelişimsel ve fonksiyonel açıdan birçok yetersizlik gelişimi açısından risk altındadırlar (31). Araştırmaların sonucunda, sepsis ve NEK atlatmış yenidoğanların düzeltilmiş yaş 18-22 ayda büyüme gelişme, geriliği, serebral palsy, görme ve işitme bozukluğu açısından daha büyük risk altında oldukları ortaya çıkmıştır. Cerrahi girişime ihtiyaç duyma durumu hastalığın şiddetini tahmin etmede bir belirteç olarak kullanılabilir. Yaklaşık 3000 ÇDDA’lı hastayı içeren bir çalışmada cerrahi tedavi görmüş olan NEK geçirmiş hastaların, düzeltilmiş yaşları 18-22 ay olduğunda medikal olarak tedavi edilen NEK geçirmiş hastalara veya NEK geçirmemiş hastalara göre daha fazla büyüme geriliğine ve nörogelişimsel hasara sahip oldukları tespit edilmiştir (31).

NEK vakaları genellikle tek tek görülür, ancak nadiren salgınlar şeklinde saptanabilir. Bu salgınlar sırasında yapılmış olan tetkikler sonucunda bu salgınların enfeksiyöz salgınlar olduğu saptanmıştır. Tek bir enfeksiyöz ajan NEK epidemileriyle ilişkilendirilememiştir ancak salgınlarda kan, dışkı ve periton sıvısından ortak enfeksiyöz ajanlar izole edilmiştir. Salgınlar daha çok kalabalık servislerde ve bakım veren kişilerin GİS rahatsızlıkları olduğu dönemlerde görülmüştür (32).

2.1.2. Patogenez

NEK’in kesin etyolojisi ve patogenezi tam olarak anlaşılmamış olmakla birlikte multifaktöriyel bir hastalık olduğu kabul edilmektedir (10). Prematüritenin yanı sıra hipoksik-iskemik hasar, formül mama ile beslenme ve patolojik bakterilerle kolonizasyon diğer risk faktörleridir (1,11) (Şekil 1). Yakın dönemde yapılan çalışmalar NEK ve perinatal morbiditeyle genetik polimorfizmin de ilişkili olabileceğini göstermiştir (33). Gastrointestinal motilitenin kaybı, intestinal mukozal bütünlüğün bozulması, mukozal enflamasyon gibi NEK’e ait özelliklerin oluşturduğu ortak sonuç intestinal apoptoz ve nekrozdur (34) Trombosit aktive edici faktör, sitokinler, nitrik oksit(NO), endotelin-1,

prostoglandinler, lökotrienler ve reaktif oksijen radikalleri NEK'e neden olan enflamasyonda ortak rol oynarlar. Tetiği çeken etkenden bağımsız olarak, bu etkenlerin tek başlarına veya birlikte aynı yol üzerinden etki ederek NEK'e yol açtıkları düşünülmektedir (35,36).



Şekil 1. Nekrotizan enterokolit gelişiminde rol oynadığı düşünülen etiyolojik faktörler (11).

2.1.2.1 Preterm doğum

Epidemiyolojik çalışmalar preterm doğum ile NEK arasında sıkı bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur. NEK'li olguların %90'dan fazlası prematüredir. Gebelik yaşı ve doğum ağırlığı düştükçe NEK riskinde artış gözlenir ve hastalık daha ağır seyreder (26,37,38). NEK gelişen bebeklerin %10'unu zamanında doğan bebekler oluşturmaktadır ve hemen hepsinde asfiksi, intrauterin büyüme geriliği (IUBG), polisitemi/hiperviskosite, kan değişimi, göbek kateteri takılması, gastroşizis, konjenital kalp hastalığı veya miyelomeningosel gibi risk faktörleri bulunur (37). Prematürelerin NEK açısından yüksek risk taşımalarının en önemli nedeni gastrointestinal motilite,

sindirim dolaşım, intestinal bariyer, bağışıklık sistemi gibi ana fonksiyonlarının da immatür olmasıdır (1).

1. Olgunlaşmamış bağırsak hareketleri ve sindirimi: İnsan ve hayvanlardaki fetal çalışmalar gastrointestinal motilitenin ikinci trimesterde başladığını ancak üçüncü trimesterde olgunlaştığını göstermektedir (39). İntestinal motilite ile ilgili çalışmalarda preterm yenidoğanların gelişmemiş hareket kalıplarına sahip oldukları ancak ağızdan beslenmenin bu cevapları olgunlaştırabildiği saptanmıştır. Motilin ve pankreatik polipeptid bağırsakta iletimi sağlayıcı motor aktiviteyi uyaran faktörlerdir. Ağızdan beslenme ile motilin seviyesinin 3 katına kadar arttığı gösterilmiştir. Dolayısıyla preterm bebeklerin ilk günlerden itibaren çok az da olsa ağızdan beslenmelerinin bakteriyel çoğalma ve göçü azaltarak NEK gelişme riskini azalttığı tespit edilmiştir (35).İntestinal motilite bağırsak lümeninde bulunan ve intestinal mukozal bariyere sunulan antijenlerin temizlenmesinde önemli bir role sahiptir. Lümen içeriğinin hızı emilim miktarını etkiler. Motilitenin yetersiz olması bağırsaklarda anaerob bakterilerin artmasına ve malabsorbsiyona neden olur (40).

Prematüre bebeklerin gastrik asit ve pepsin üretimi düşüktür, amilolitik, lipolitik ve proteolitik salgıları yeterli düzeyde değildir. Yutularak alınan mikroorganizmalara karşı önemli bir savunma sistemi olan gastrik asit ve pepsin miktarları ancak 1.ay civarında erişkin düzeyine gelir. Mide asidinin düşük düzeyde olması lümen içinde pH'ın yükselmesine neden olur ve sonuçta bakteriyel kolonizasyon için daha uygun bir ortam oluşur (41). Prematurelerin intestinal motilitelerinin yetersiz olmasının yanı sıra sindirim fonksiyonlarının da yetersiz olması tam olarak sindirilememiş moleküller nedeniyle intestinal hasarın oluşmasına neden olur (42).

2) Olgunlaşmamış bağırsak bariyer işlevi: İntestinal epitelyal bariyerin biyokimyasal ve yapısal kısımları yeterince olgunlaşmazsa bakteriler daha derin dokulara ilerleyerek enflamasyana neden olurlar. Prematurelerde özellikle NEK geçirenlerde immunglobulinler (Ig), proteinler ve karbonhidratlar gibi makromoleküllerin bağırsak geçirgenliğinin yüksek olduğu saptanmıştır (40) Fetal bağırsak sekresyonu ve absorpsiyonu prematürelerde olgunlaşmamıştır, amniotik sıvının da etkisiyle 26 haftadan 40. haftaya kadar geçen zamanda ancak gelişimini tamamlar (42). Bu nedenle patojenler

ve toksinler prematürelde bağırsak lümeninden etkin olarak uzaklaştıramamanın yanı sıra gevşek intestinal bariyer nedeniyle de kolay emilirler.

Goblet hücreleri müsin salgılayarak intestinal mukoza üzerinde koruyucu kalın bir tabaka oluştururlar. Bu mukus tabakası bakterilerin epitel hücrelerine doğrudan bağlanmasına engel olur, yapışan bakterileri bir araya toplar ve uzaklaştırılmalarını artırır. Gelişim sırasında müsin genlerinin bağırsakta ekspresyonu değişir ve erişkin tipte ekspresyonun gebeliğin 23-27. haftaları arasında olduğu düşünülmektedir. Olgunlaşmamış bir müsin engeli, artmış bağırsak geçirgenliğine ve bakteri bağlanmasına neden olur. Bu durumda da bağırsak epitel engelinde bir gedik oluşur ve bu da patojen ve bazen patojen olmayan uyarılar sonucu bağırsakların hasara daha yatkın olmasını sağlar (1).

Prematürelde intestinal epitelyal bariyerin yetersiz fonksiyonunun bir diğer nedeni de biyokimyasal savunma kısmındaki olgunlaşma bozukluğudur. Bağırsak kriplerinin tabanına yerleşmiş ve özelleşmiş salgılayıcı enterositler olan Paneth hücreleri; lizozim, fosfolipaz A2 ve küçük antimikrobiyal peptidler salgırlar. Bu salgılar bakteriyel toplulukların yapısını ve dağılımını etkilemektedir. Bağırsak hücrelerince üretilen 2 önemli antimikrobiyal peptid sınıfı vardır. Bunlar “defensin”ler (α ve β) ve “kathelisidin”lerdir. Mikrobik uyarıya yanıt olarak Paneth hücreleri “ α defensin” salgırlar. Bağırsak epitel hücreleri ise genel olarak “ β defensin”ler salgırlar. Bazı hücreler de proenflamatuar uyarılar sonrası “defensin”lerin ekspresyonunu artırır. Bu antimikrobiyal peptidler; bakteriler, virüsler, mantarlar, protozoalar ve spiroketler de dahil olmak üzere geniş bir mikroorganizma grubuna karşı biyoaktivite gösterirler. Olgunlaşmamış bağırsak bu patojenlere karşı hassastır (43).

Fare ve insanlarda yapılmış olan çalışmalar fetusun gelişim dönemleri boyunca Paneth hücrelerince yapılan “ α defensin” ekspresyonunun değiştiğini göstermiştir. Paneth hücre sayısı ve “ α defensin” ekspresyonu 24 hafta ve altındaki preterm yenidoğanların bağırsaklarında erişkinlere göre daha düşük düzeyde saptanmıştır (1). Ayrıca NEK nedeniyle opere olmuş yenidoğanların bağırsak doku örneklerinde çok sayıda Paneth hücresi ve “ α defensin” kopyası bulunmuş olmasına rağmen Paneth hücrelerindeki “ α defensin” miktarı kontrollere göre düşük bulunmuştur (1).

Olgunlaşmamış bağırsaklarda büyüme faktörleri veya büyüme faktörlerinin reseptörlerinin eksikliği gösterilmiştir. Epidermal büyüme faktörü (EGF) bağırsak gelişimindeki en önemli büyüme faktörüdür ve enterositlerin bazolateral yüzeyinde EGF reseptörleri tanımlanmıştır (44). EGF'in in utero eksojen infüzyonunun intestinal enzim aktivitesini ve intestinal gelişimi uyardığı gösterilmiştir . Gebelik haftası ilerledikçe amniotik sıvıdaki EGF konsantrasyonu artar (45). EGF'in tükürükteki düzeyi gebelik haftası ile direk ilişkilidir (45). Yapılan çalışmalarda özellikle cerrahi tedavi gerektiren NEK hastalarında serum ve tükürükteki EGF düzeyleri düşük saptanmıştır (46). EGF'in klinik kullanımıyla ilgili yapılan çalışmalarda epitelyal rejenerasyonda artışa yol açtığı saptanmıştır (47).

Preterm yenidoğanların bağırsak geçirgenliği büyük çocuklar ve erişkinlere göre artmıştır. Bir çalışmada gebelik yaşı 33 haftadan küçük olan yenidoğanlar, term yenidoğanlarla aynı süt ile beslendiklerinde serum β -laktoglobulin konsantrasyonlarının daha yüksek olduğu bulunmuş, bunun da preterm yenidoğanların bağırsak geçirgenliğinin artışına kanıt olabileceği belirtilmiştir (48). Prostaglandinler, hücreler arası alanda sıkı bağların direncini artırarak bağırsak bariyerinin tamirinde görev almaktadırlar. İndometazin kullanımı ile bağırsağın kendiliğinden delinmesi arasında ilişki tespit edilmesi, prostaglandin inhibitörü olan indometazinin bağırsak bariyerini bozmasına bağlanmıştır (1). Bir başka çalışmada ise özellikle NEK'li olgularda NO'nun enterositler tarafından aşırı miktarda üretildiği, aşırı NO'nun da bağırsak bariyerini bozduğu gösterilmiştir (49). Bağırsak epitel bariyerinin oluşması, işlevsel ve biyokimyasal düzenlemelerin olgunlaşma süreçleri konusundaki ileri dönük çalışmalar NEK patogenezinin anlaşılmasına katkıda bulunacaktır (1).

3)Bağırsağın doğal bağışıklığının olgunlaşmamış olması: Fetus terme ulaştığı zaman bazı antijenlere karşı duyarlılaşsa da, tam fonksiyon gösteren bir bağışıklık sistemine sahip değildir ve GİS'I sterildir. Doğumdan hemen sonra başlayan değişikliklerle yenidoğanın bağışıklık sistemi olgunlaşır ve gastrointestinal sistem bakterilerle kolonize olur. (50). Doğum sırasında ve annenin cildindeki bakterilere maruz kalma, anne sütündeki immünolojik faktörler yenidoğanın bağırsağındaki ve bağırsak ilişkili bağışıklık sistemini oluştururlar (51)

NEK'e bağlı ortaya çıkan ödem, koagulasyon nekrozu ve kanama iltahabi bir cevap sonucunda meydana gelir (48). NEK'in patogenezinde rol oynadığı düşünülen iltahabi aracilar arasında trombosit aktive edici faktör (PAF), tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ve interlökinler (IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 ve IL-18) yer almaktadır.

Amacı patojenlere karşı savunma ve hasarlı dokuda ilk cevabı oluşturmak olan iltahab, çok sıkı kontrol edilen programlanmış bir konak cevabıdır. Tehlike iletileri, iltahabi hücreleri çekmek için damarsal geçirgenliği arttıran kemotaktik ajanların ve iltahabi araciların salınımına yol atığında iltahab süreci başlar (1). İltahab bağırsağın mikroorganizma yönünden zengin ortamında organizmanın hayatta kalması için çok önemli bir savunma mekanizmasıdır. Ancak iltahabi yanıt aynı zamanda nötrofillerden proteaz ve oksidan maddelerin salınıp doku hasarı oluşturmasına da neden olur. Bu moleküller bağırsak epitel engeline hasara ve olağan durumlarda bu engeli geçemeyecek mikroorganizmaların savunmayı aşmasına yol açarlar. Böylece epiteli açan mikroorganizmalar daha ileri proenflamatuar aktivasyona ve doku hasarına neden olabilirler. Bazı in vitro çalışmalar sonucunda olgunlaşmamış bağırsak hücrelerinin patojenik uyarılara aşırı iltahabi cevap göstermeye meyilli oldukları gösterilmiştir (52). Araştırmacılar bunun nedeninin gelişimsel olarak henüz yeterli düzeye erişmemiş olan nükleer faktör kappa B (NF- κ B) inhibitörü eksikliğinin daha fazla NF- κ B aktivitesi oluşturması sonucu olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu modelde artmış iltahabi cevap artmış hücresel enflamasyona ve kontrolsüz hücre hasarına neden olabilir. Diğer bir hipotez ise toll like reseptör-4 (TLR-4)'n olağandışı ekspresyonunun bağırsak hücrelerinde aşırı artmış proenflamatuar cevaplara yol açabileceğidir. Yapılan hayvan çalışmalarında bağırsak epitel TLR-4'lerinin hipoksi, mama ile beslenme gibi stres faktörlerinden dolayı olağandışı artması sonucunda var olan normal bakteriyel kolonizasyona rağmen artmış iltahabi sinyalizasyon oluştuğu saptanmıştır (52).

Hastalığın patofizyolojisi ile ilgili iddia edilen diğer bir mekanizma ise azalmış iltahabi sinyalizasyonun aşırı bakteriyel çoğalmaya neden olduğudur. Preterm yenidoğanlarda iltahabi yolakların aktive edilememesi sonucu hücre ölümünü önleyen (antiapoptotik), hücre koruyucu (sitoprotektif) faktörlerin arttığı düşünülebilir . Ancak bağırsak enterositlerindeki NF- κ B aktivasyonu sıfır olan farelerde geçici hipoksiye cevabın epiteliyal apoptoz olduğu grlmştir (53). İltahabi cevabın gelişmemiş

olmasından dolayı çevresel stresle karşılaşan hücrelerin apoptozise uğrama oranları artabilir. Bu nedenle konağın sağlığı; aşırı proenflamatuar aktivasyon (doku hasarına yol açarak klinik sonucu oluşturur) ve yetersiz enflamasyon oluşumu arasındaki dengeye bağlıdır. Sıçanlarda yapılmış bir çalışmada erken apoptozun NEK patogenezinde bir faktör olduğu öne sürülmüştür (54). Günümüzde NEK patogenezinde cevaplanmayı bekleyen başlıca soru artmış enflamasyonun mu yoksa tam tersi azalmış enflamasyonun mu hastalık oluşumunda daha fazla rol oynadığıdır. Bu yolların her ikisi de farklı klinik senaryolarda, patogenezin farklı bölümlerinde rol oynayabilmektedir. Bir kez epitel hasarı başlamış ve ilerlemişse bu NEK oluşumuna yol açmaktadır (1).

4)Bağırsağın olgunlaşmamış dolaşım cevabı : Olgunlaşmamış bağırsak dolaşımı anormal bakteri varlığında veya beslenmeye cevap olarak bağırsakta hipoksiye ve iskemiye neden olabilir (50). Bazı çalışmalarda immatur hayvanların iskemi veya hemorajiye cevap olarak dolaşım düzenlerini değiştirdikleri söylenirken bazı çalışmalar böyle olmadığını göstermektedir (55,56). Endotel hücrelerinden NO'in az üretilmesi sonucunda pretermelerde bağırsak dolaşımının doğum öncesi dönemden, doğum sonrası döneme geçişinin bozulduğu ve bunun da iskemik hasara eğilimi artırdığı öne sürülmüştür (57,58).

Preterm yenidoğanların sıklıkla vazokonstriksiyon, hipotansiyon ve tromboz atakları yaşamaları GİS kan akımını azaltır ve bağırsak mukozasının hasar görme olasılığını artırır (12,13). Göbek arter kateteri de ayrıca kan damarı çapını ve kan akımını azaltarak ya da arteriyel spazm veya mikroemboli gelişimine neden olarak bağırsaklarda iskemiye neden olabilir (59). Patent duktus arteriyosus (PDA) preterm yenidoğanlarda daha sık görülür ve soldan sağa şanta neden olarak mezenterik damar yatağına giden kan akımını azaltır. Preterm yenidoğanlar olgunlaşmamış dolaşım sisteminin yanı sıra kendilerine ait komplikasyonlar nedeniyle de dolaşım problemi yaşarlar.

2.1.2.2 Beslenme

NEK'li olguların %90'dan fazlası enteral olarak beslenen bebeklerdir. Enteral besleme ile NEK arasındaki ilişki tam olarak bilinmese de; hiperosmolar formül mama veya yüksek hacimli ve hızlı beslemenin, prematüre bebeklerde kısa zincirli yağ asitleri ile beslemenin NEK riskini arttırdığı bildirilmektedir (37) Özellikle yüksek hacimli

agresif beslemenin mide distansiyonu yaratarak splenik veya mezenterik dolaşımı bozacağı ve intestinal iskemiye yol açabileceği belirtilmektedir (37). Günlük enteral hacim artışları makul olduğu halde enteral beslenmeye karşı en ufak bir intolerans şüphesi geliştiğinde beslenmenin kesilmesi ile NEK sıklığının azaldığı gözlemlenmiştir (60) Beslenme miktarının 20 ml/kg/gün'den hızlı artırılmasının NEK sıklığını arttırdığı tespit edilmiştir (61,62) Minimal enteral beslenme veya az miktarda besini trofik etken olarak kullanıp GİS mukozasının gelişiminin sağlanması preterm yenidoğanlarda uygun bir çözüm olarak gözükmektedir. Böylece beslenmeye tolerans artmakta, kolestaz riski azalmakta ve bağırsak trofik hormon seviyeleri artmaktadır (63). Hayvan çalışmalarında kısa zincirli yağ asitleri ile beslemenin barsaklara zarar verdiği gösterilmiş ve bu durumun özellikle prematürelde belki de laktaz ve diğer bağırsak enzim aktivitelerinin yetersizliği nedeniyle olabileceği belirtilmiştir (37).

İnsan ve hayvan çalışmalarında ise anne sütü ile beslemenin NEK insidansını azalttığı gösterilmiştir. Anne sütü, içerdiği; IgA, lökosit, laktoferrin, lizozim, musin, sitokin, EGF, enzimler, oligosakkarid, poliansatüre yağ asitleri gibi birçok madde ile antibakteriyel, anti-inflamatuvar ve mukoza koruyucu etkilere sahiptir (37). Glutamin ve nükleotidler gastrointestinal hücre metabolizmasına yardımcı olur. EGF direk olarak gastrointestinal fonksiyonları geliştirir ve bağırsak maturasyonunu sağlar.

Prematürelde tek başına enteral beslenme ile NEK patogenezinde önemli rol oynayan PAF'ın plazma düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (64). Amer ve arkadaşlarının çalışmasında prematüre ve term yenidoğanlarda enteral beslenmeden sonraki ilk mekonyum ile 14. gün dışkılarında PAF ve PAF spesifik asetil-hidrolaz (PAF-AH) düzeyleri ve bunların NEK ile ilişkisi araştırılmış; sonuç olarak 14. gün dışkısında, mekonyuma göre PAF düzeylerinin anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır (65). NEK gelişen yenidoğanların dışkılarında da PAF düzeylerinin, sağlıklı yenidoğanlara göre belirgin yüksek olduğu gösterilmiştir. PAF-AH düzeyleri arasında ise gruplar arasında belirgin bir fark saptanmamıştır. Sonuç olarak; enteral beslenmenin, intestinal dokuda lokal PAF üretimini artırarak NEK gelişiminde etkili olabileceği öne sürülmüştür.

2.1.2.3 Hipoksi-İskemi

İnsanlarda NEK'te görülen patolojik değişikliklere benzer patolojik değişiklikler hayvan NEK modellerinde hipoksik-iskemik hasar yoluyla oluşturulmaktadır. GIS kan akımının bozulması, NEK'te en çok suçlanan etiyolojik faktörlerden biri olan mukozal kan akımının azalmasına yol açar. Önemli bir başlatıcı faktör olduğu kabul edilen bu durumun mukozanın hipoksik kalması, hücrelerin hasar görmesi ve nekroze olması ile sonuçlandığı düşünülmektedir (1). 1975'ten beri birçok araştırmacı NEK'in düşük kan akımının sebep olduğu bağırsak mukozal hasarı ve buna bağlı ikincil bakteriyel yapışma ile birlikte hipoksi sonucunda olduğunu ileri sürmüşlerdir (5,11).

Perinatal dönemde çeşitli nedenlerle fetusun oksijen ihtiyacının yerine getirilememesi perinatal asfiksi ile sonuçlanır. Llyod'un "Dalma teorisi"ne göre belirli bir süre devam eden hipoksik durumlara tolerans gösterebilen splenik dolaşım, bu sürenin uzaması halinde yeterli kan akımını sağlayamamakta ve bağırsak mukozasında kalıcı zedelenmeler, iskemik hasar gelişmektedir (1,5). Yapılan çalışmalarda hipertansif, preeklampsili veya kokain kullanan anne bebeği gibi doğum öncesi dönemde azalmış plasental kan akımına maruz kalmış yenidoğanlarda NEK sıklığının artmış olduğu tespit edilmiştir (11). PDA veya konjenital kalp hastalığı gibi doğum sonrası azalmış sistemik kan akımına neden olan durumlarda da NEK sıklığının artmış olduğu tespit edilmiştir (5). Uzamış membran rüptürü, annede infeksiyon, fetal distres, doğum odasında canlandırma ihtiyacı gösterme ve düşük Apgar skoruna sahip olma doğum sonrası sistemik kan akımını azaltan durumlardır. Doğum sonrası sorunlardan tekrarlayan apne, hipotansiyon atakları, umbilikal vasküler kateterlerin takılması, kan değişimi ve PDA da sistemik kan akımını ve dolayısıyla da mezenterik kan akımını azaltır. Bazı çalışmalar yukarıdaki bilgilerin tersine perinatal olayların kontrol gruplarında da benzer sonuçlara yol açtığını ve kontrol gruplarında NEK gelişiminin benzer oranlarda olduğunu saptamışlardır (5). NEK'in histolojik bulgularında gastrointestinal sistemde mukozal ülserasyon, ödem, kanama, damarsal genişleme, ilerlemiş olgularda tam kat koagülasyon nekrozu ve bağırsak delinmesi vardır. Tüm bu bulgular iskemi ile uyumludurlar (11,59,66,67).

Mukozal nekroz ve anatomik bütünlüğün bozulması ile bakteriyel invazyon için uygun şartlar oluşur (6). NEK'te iskemik nekroz en fazla ileumun distalinde ve kalın

bağırsağın proksimalinde oluşur, bu alanların diğer bağırsak bölümlerine göre daha az damarlanmaya sahip olması da dikkat çekicidir (50).

Son yıllarda NEK patogenezinde iskemik mukozal hasarın moleküler düzeydeki bulguları yayınlanmaya başlamıştır (11). Hayvan çalışmalarında intestinal iskemiye takiben reperfüzyon sonucu barsak nekrozu geliştiği gösterilmiştir (68). Hipoksi ve reoksijenasyon sonrası intestinal zedelenme ortamdaki serbest oksijen radikalleri ve enflamatuvar mediatörler aracılığıyla gelişir. Ksantin oksidaz barsaktaki serbest oksijen radikallerinin ana kaynağıdır. Hidrojen peroksit, süperoksit ve hidroksil anyonu hasardan sorumlu en önemli serbest oksijen radikalleri olarak bilinirler. Serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, nötrofil aktivasyonu ve deoksiribonükleik asit (DNA) hasarı oluşturarak hücre ölümüne, bölgesel hasar gelişimine ve sistemik bulgulara neden olurlar (68). Deneysel çalışmalarda serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ya da etkisini önleyen maddeler verildiğinde intestinal hasar ve NEK gelişiminin azaldığı birçok çalışma ile gösterilmiştir (68,69,70). Hipoksi ve reoksijenasyon sonucu gelişen intestinal hasarlanma sonucu, epitelyal hücreler ve aktive nötrofillerden ortama çeşitli inflamatuvar mediatörler salınır. Bu inflamatuvar mediyatörlerin başlıcaları PAF, TNF- α , NO, IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 olarak sayılabilir (37). Birçok çalışmada NEK'te bu sitokinlerin lokal ve sistemik olarak arttığı ve doku hasarında birincil rol oynadıkları saptanmıştır (34). Bu mediatörlerin intestinal mukozal zedelenmeyi daha da artırarak ülserasyon ve nekroz oluşturdukları düşünülmektedir (34).

2.1.2.4 Anormal bakteriyel kolonizasyon ve enfeksiyon

YYBÜ'lerinde enfeksiyon kontrolüyle ilgili önlemlerin artırılmasıyla NEK vakalarının insidansında ve ciddiyetinde azalma gözlenmesi patogenezde enfeksiyonların rol oynadığını düşündürmektedir (10). Bunun yanı sıra NEK ile en çok ilişkili bağırsak bölgeleri olan ileum ve proksimal kolon da aşırı bakteriyel yükün bulunması, in utero dönemde NEK vakalarının saptanmaması patofizyolojide bakteriyel kolonizasyonun önemini desteklemektedir. YYBÜ'de NEK'in zaman zaman epidemiler şeklinde ortaya çıkması, aynı zamanda hastalık görülen yenidoğanlarda aynı enfeksiyöz ajanın etken olarak tespit edilmesi patogenezde bakterilerin rol aldığını destekleyen bulgulardır (5,62). Epidemiler sırasında hastalardan ve hastalara bakım verenlerden alınan örneklerde aynı

mikroorganizmalar üremektedir. Bilinen herhangi bir risk faktörü taşımayan bebeklerde de NEK gelişebilmektedir. NEK herhangi bir perinatal hasardan uzun zaman (haftalar, aylar) sonra oluşabilmektedir. Ayrıca uygun konaklarda Clostridium suşlarının oral verilmesinden sonra NEK benzeri hastalık oluşmaktadır (71). Deneysel olarak endotoksin verilmesinden sonra NEK benzeri lezyonlar da oluşturulmuştur (72). Endotoksinler, TNF- α ve PAF salınımına aracılık ederler. NEK'li preterm yenidoğanların serumlarında TNF- α , PAF ve IL-6 seviyeleri yüksektir (73,74). NEK'te sıkça görülen bir bulgu olan pnömötosis intestinalis, %30 hidrojen gazı içerir. Bu gaz ise sadece bakteriyel metabolizma sonucu üretilmektedir (67).

Anne sütü ile beslenen bebeklerde barsak Bifidobacteria ve Lactobacilli ile kolonize olurken, formül mama ile beslenenler koliform, enterokok ve bacteriodes cinsi bakterilerle kolonize olmaktadır. Prematüre bebeklerin barsak florası maternal flora ile ilişkinin azlığına, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı ve nazokomiyal patojenlere bağlı olarak term bebeklere kıyasla belirgin farklılıklar göstermektedir. Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı ve enteral beslemenin geciktirilmesi anormal kolonizasyona neden olmaktadır (37).

Nekrotizan enterokolite sebep olan mikroorganizmayı tanımlamak çok zordur. Kültürlerde üreyen mikroorganizmaların patojenler mi yoksa antibiyotik tedavisine bağlı ikincil fırsatçı bakteriler mi olduğu ayırt edilememektedir (5).

NEK'te en sık Escherichia coli, Klebsiella, Enterobacter, Pseudomonas, Salmonella gibi gram negatif bakteriler saptanırken; Clostridium perfringens, Clostridium difficile, Clostridium butyricum, koagülaz negatif stafilokoklar gibi gram pozitif bakteriler ve coronavirüs, rotavirüs ve enterovirüsler de saptanabilir (1,28,48). NEK'li olguların sadece %20-30'unun kan kültüründe üreme saptanabilirken, bakteriyemi oranının daha sık olabileceği belirtilmektedir (37).

Nekrotizan enterokolit patogeneğinde mantarların olayı başlatıcı etkenler olduğuna dair kanıt yoktur, NEK'li hastaların GİS'inde ikincil olarak ortaya çıktıkları düşünülmektedir. Geç dönemde kaybedilen birçok NEK'li hastada neden olarak Candida türlerine bağlı gelişen fungal septisemi sorumlu tutulmuştur (5).

Lipopolisakkarit (LPS), lipoteikoik asit ve endotoksin gibi bakteri hücre duvarı komponentlerinin barsak epitelinde bulunan TLR aktive ettiği ve bunun da inflamatuvar

kaskadı uyararak intestinal hasarlanmada rol aldığı belirtilmektedir (37,52). LPS'ler güçlü PAF salgıyacılarıdır ve LPS aracılı intestinal hasarlanmada önemli rolleri vardır. PAF antagonistleri bu hasarlanmayı önlemektedir. TLR aktivasyonu sitokin cevabına ve belki de PAF'ın etkinliğini arttırarak NEK gelişimine katkıda bulunmaktadır (52).

Bakteriler ayrıca endotoksinleri yoluyla da NEK patogenezinde rol oynarlar. Çalışmalarda bakteriyel endotoksinlerin intestinal sistemdeki PAF, TNF- α ve IL-1 üretimini aktive ederek inflamatuvar kaskadı uyardıkları ve intestinal hasar gelişimini sağladıkları gösterilmiştir. Enteropatojen kolonizasyonunu önleyen ve intestinal olarak yararlı etkileri saptanan *Bifidobacterium infantis* verilen yenidoğan farelerde NEK insidansının azaldığı gösterilmiştir (75). Başka bir çalışmada yavru farelere oral olarak probiyotik bir ajan olan *Saccharomyces boulardii* verilmiş, kontrol grubuna göre bu farelerde intestinal hasarın daha az olduğu, intestinal hasarda major rol oynayan PAF düzeylerinin daha düşük olduğu saptanmıştır (76).

Bağırsağın anaerobik ortamında, bakteriler beslenme ile alınan karbonhidratları hızla hidrojen, karbondioksit ve metan gibi gazlara ve asetik asit, propiyonik asit ve bütirik asit gibi kısa zincirli yağ asitlerine (short chain fatty acids "SCFA") fermente eder (77). Pnömotosis intestinalis bu gazların oluşumu neticesinde gelişmektedir. Barsaklarda SCFA artışı bakterilerin aşırı çoğalmasına ve intestinal mukoza hasarlanmasına neden olabilir (77). Savunma mekanizmaları ve laktaz gibi bazı enzim sistemleri yetersiz olan prematürelere, laktozlu besin alımının SCFA üretimine neden olabileceği, aşırı SCFA üretiminin ise NEK patogenezinde anahtar bir rol oynayabileceği belirtilmektedir (78).

2.1.2.5 İlaçlar

NEK oluşumunda etkili olabilecek birçok ilaç ve madde vardır. Prematürelere retinopati profilaksisinde kullanılan oral vitamin E, hipokalsemiyi önlemek için kullanılan oral kalsiyum laktat, mekonyum ileusu tedavisinde verilen hiperosmolar kontrast maddeler ile oluşmuş NEK olguları bildirilmiştir (79). PDA kapanmasını hızlandırmada kullanılan indometazin, prostaglandin sentetazı bloke ederek vazokonstrüksiyona neden olan bir ajandır ve mezenterik kan akımını azaltarak prematürelere NEK'e yol açabileceği bildirilmiştir (80). Apne tedavisinde kullanılan metilksantin türevleri olan aminofilin ve teofilin barsak hareketlerini yavaşlatmanın

yanında ürik asit metabolizmasıyla ilişkili olarak toksik radikaller oluşturup eritrosit hasarına ve bakteriyel kolonizasyona yol açar (81).

2.1.2.6 Genetik

NEK için genetik predispozisyon yaratabilecek faktörlerin araştırılması bu hastalık açısından risk taşıyanlar için önleyici stratejiler ve tedavi seçeneklerinin oluşturulmasını sağlayabilir (50). Çalışmalar NEK üzerinde etkili mediatörlerle ilişkili genetik polimorfizmleri saptamak üzerinde yoğunlaşmaktadır. Genetik farklılıklar sitokinlerin enflamasyona verdiği yanıtta değişiklikler yaratabilir (33). NEK riskinin IL-18 AA genotipinin frekansıyla ilişkili artış gösterdiği saptanmıştır. AA genotip frekansı evre 3 NEK vakalarında evre 1 ve evre 2 NEK vakalarına göre daha yüksek saptanmıştır (33). Bir diğer genetik faktör pro-inflamatuar sitokin TNF- α olabilir. Hayvan çalışmalarında anti-TNF- α ile tedavinin NEK sıklığını ve hastalığın ağırlığını azalttığı gösterilmiştir ancak araştırmacılar henüz TNF- α gen farklılıklarıyla NEK arasında bir ilişki bildirmemiştir (82)

2.1.2.7 Vazoaktif ve Enflamatuar Mediatörler

Enteral beslenmeyle birlikte bakteriyel kolonizasyon olgunlaşmamış gastrointestinal mukozanın hasarlanmasına yol açarak NEK gelişmesine neden olan ortak yolu tetikler (83). Potansiyel biyolojik aktif fosfolipitlerin ve sitokinlerin salınması, araşidonik asit metabolizmasının ürünleri, vazoaktif mediatörler, nörotransmitterler, hasarlı gastrointestinal hücrelerden salınan reaktif oksijen radikalleri doku hasarına ve NEK'e neden olan enflamatuar cevabı oluştururlar (83). Hayvan ve insan hücre çalışmaları pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar faktörler arasındaki dengenin prematürelde pro-inflamatuar faktörler yönünde oluşunu göstermektedir (83)

2.1.2.7.1 PAF: NEK'te önemli rol oynayan proinflamatuar bir fosfolipid aracıdır (34,35). Deneysel çalışmalarda PAF verilmesiyle barsaklarda histolojik açıdan NEK'e benzer bir durum ortaya çıkmaktadır (3). Membran fosfolipidlerinden, endotel, makrofaj, nötrofil, hepatosit, glial hücre, keratinosit, bağırsak epitel hücreleri de dahil birçok hücreden fosfolipaz A2 aracılığı ile salınır. PAF'ın NEK patogenezinde etkili temel

iltahabi aracı olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (5,34,84,85). PAF bilinen en güçlü mezenterik vazokonstriktör maddedir ve yarı ömrü çok kısadır. Kapiller geçirgenliğin artması, pulmoner hipertansiyon, nötrofil-trombosit agregasyonu, degranülasyon, bronkokonstrüksiyon ve iskemik bağırsak nekrozu gibi birçok biyolojik etkilere de sahiptir (34,85). PAF, bu güçlü vazokonstriktör etkisi ile intestinal iskemi sonucu mukozal hasar ve NEK'e neden olabilirken; bu etkisini ikincil olarak üretimini artırdığı serbest oksijen radikalleri, TNF- α , lökotrien B4 (LTB4), lökotrien C4 (LTC4) gibi iltahabi araçılar aracılığı ile de yapar. Deneysel çalışmalarda PAF uygulaması sonrası TNF- α , LTB4, LTC4, noradrenalin, prostaglandin ve serbest oksijen radikallerinin artışı gösterilmiştir (85). Hayvanlara PAF uygulandıktan sonra oluşan şok, kapiller sızıntı ve iskemik bağırsak nekrozu gibi sistemik etkiler yenidoğanlardaki ciddi NEK kliniği ile benzerlikler taşımaktadır (1,5). Farelere PAF antagonisti verilen çalışmalarda da, intestinal nekrozun azaldığı gözlenmiştir (64). Bazı çalışmalarda NEK'li hastalarda plazma PAF düzeylerinin kontrollere göre anlamlı şekilde arttığı, NEK şiddeti arttıkça PAF düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir. Ayrıca yenidoğanın beslenmesi ile birlikte PAF'ın düzeyi plazma ve dışkıda artar (34,85). NEK klinik olarak ortaya çıkarsa dışkıdaki bu artış daha belirgin olur (34). Bu nedenle ağızdan beslenmenin PAF üzerinden etki ederek NEK'e neden olabileceği düşünülmüştür. Oluşturulan hipoksi ile de plazma PAF düzeylerinin arttığı saptanmıştır. Sonuçta; sepsis, hipoksemi, mama ile kontrolsüz beslenme, plazma PAF düzeylerini artırarak NEK'e neden olabilir (40). Asetilhidrolaz (AH) PAF'ın yarı ömrünü sınırlandıran ve birkaç dakikaya indiren bir enzimdir. Bütün bebeklerde düşük miktarda bulunan bu enzim, NEK'li bebeklerde kontrol grubuna göre daha düşük düzeydedir. Normalde erişkinlerdeki enzim seviyesine ancak 6. haftadan sonra ulaşmaktadır (40). Ticari mamalarda bu enzim yoktur. Anne sütünde mevcut olan PAF-AH enzimi anne sütünün NEK'e karşı olan koruyuculuğunun bir kanıtıdır. Aynı koruyucu özellik bekletilmiş anne sütünde yoktur (3). Preterm ve term yenidoğanların annelerinin kolostrumdaki PAF düzeylerinin term yenidoğanların olgun sütlerine göre düşük olduğu saptanmıştır (86). Kolostrumun NEK'ten koruyucu etkisinin düşük düzeyde PAF içermesi ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (72,85).

2.1.2.7.2 TNF-alfa, diğer sitokin ve kemokinler:

Yapılan deneysel çalışmalarla PAF'ın yanı sıra TNF- α , IL-6 ve IL-8'in de NEK gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir (40,72). Özellikle TNF- α , PAF ile benzer özellikler gösterir. Endotoksin ilişkili şok ve özellikle bağırsakta doku hasarına yol açmaktadır (72). TNF- α ; endotoksin, gram pozitif bakteri enterotoksini, virüsler, mantarlar ve parazitler gibi birçok inflamatuvar uyararla salınır (87). Makrofajlar, lenfositler, nötrofiller, endotel hücreler, düz kas hücreleri ve intestinal epitelyal hücreler bağırsaktaki önemli TNF- α kaynaklarıdır (87). TNF- α etkisini TNF reseptörlerine bağlanarak gösterir. TNF reseptörlerine bağlanmak hücre aktivasyonu ile lokal inflamasyon cevabını başlatır. TNF- α hasarı izleyen erken dönemde salınır ve IL-1 β , IL-6 ve IL-8 salgılatır (88). Bunun yanında glukokortikoidlerin, TGF- β ve IL-10'un salgılanmasını inhibe eder. NEK tedavisi uygulanan yenidoğanların asit sıvısında IL-1, TNF- α ve IL-6 düzeylerinde yükseklik gözlenmiştir (88). Doku düzeylerine bakıldığında, NEK'li yenidoğanlardan çıkarılan bağırsak örneklerinde IL-1 ve TNF- α mRNA düzeylerinin yükselmiş olduğu bulunmuş ve cerrahi anastomoz sonrası bu sitokin düzeyleri belirgin olarak düşüş göstermiştir (34).

IL-6 yaklaşık 26 kD'luk bir sitokin olup T lenfosit, B lenfosit, monosit, damar endotel hücreleri, fibroblastlar ve epitel hücreleri, mast hücreleri tarafından sentez edilir. Mikroorganizmalar, mikrobiyal ürünler, TNF- α , IL-1 β ve IL-6 salınımını uyarır. Makrofajlar, endotel hücreler ve intestinal epitelyal hücreler bağırsaktaki önemli IL-6 kaynaklarıdır (89). Akut faz proteinlerinin üretimi, B hücrelerinin gelişimi, antikor oluşumu, T hücre proliferasyonu hematopoetik büyüme faktörlerinin aktivasyonu gibi olaylarda IL-6'nın düzenleyici etkileri vardır (89). IL-6'nın anti-inflamatuvar etkileri arasında metalloproteinlerin doku inhibitörlerinin üretimi ve süperoksit yapımının inhibe edilmesi bulunur (90). Nekrotizan enterokolitli ve/veya sepsisli yenidoğanlarda plazma ve dışkı IL-6 düzeyleri kontrollere göre belirgin olarak yüksektir. En yüksek düzeyler sepsis ve NEK'in birlikte olduğu hastalarda görülürken, klinik durumlardan yalnızca biri varsa yükseklik orta derecededir. IL-6 düzeyleri ciddi hastalığı olanlarda ve sonradan ölenlerde belirgin olarak yüksek bulunmuştur (74,91). IL-6'nın inflamasyonda çift taraflı bir etkisi olması nedeniyle NEK hastalarında artmış morbidite ve mortaliteyle ilişkili olduğu halde anti-inflamatuvar düzenleyici olarak da rol oynuyor olabilir (50).

NEK gelişiminde diğer etkili sitokinler; IL-12 ve IL-18'dir. IL-12 sentezi ve salınımı bakterilere, bakteriyel ürünlere ve virüslere erken cevap olarak gerçekleşir (92). Makrofajlar, nötrofiller, B hücreleri ve dendritik hücreler bağırsaktaki önemli IL-12 kaynaklarıdır (92). IL-18 ise IL-1'le ortak fonksiyonel ve yapısal özellikler gösterir. IL-18 sentezi lipopolisakkaritler tarafından uyarılır (93). Makrofajlar, dendritik hücreler, intestinal epitelyal hücreler bağırsaktaki IL-18 kaynaklarıdır (93). IL-12 ve IL-18, T helper-1 ve doğal öldürücü (natürel killer) hücrelerin gelişimini artırarak interferon- γ üretimini uyarır, makrofajları aktive eder, kompleman aracılı antikorların üretimini sağlar (104). Bu sitokinlerin mRNA ekspresyonu NEK geliştirilen sıçan bağırsağında yükselmiş olup, bu artış doku hasarının derecesiyle doğru orantılı saptanmıştır (34).

IL-8 sentez ve salınımı lipopolisakkaritler, TNF- α ve IL-1 β gibi birçok uyarana cevap olarak tetiklenir (94). IL-8, nötrofil ve bazofillerin enflamasyon alanına gelmesi, nötrofillerin aktivasyonu ve dokuya göçü, akut faz proteinlerinin üretiminde rol alır. NEK'li hastaların bağırsak örneklerinde, IL-8 mRNA ekspresyonu artmıştır ve bu artışın derecesi hastalığın ciddiyeti ile doğru orantılıdır. Benzer şekilde NEK'li yenidoğanlarda plazma IL-8 düzeyleri yükselmiştir ve düzeyler klinik ciddiyetle doğru orantılıdır (95). Herhangi bir iltahabi uyarı ile karşılaşma sonrası fetal bağırsak epitel hücreleri, term yenidoğanın bağırsak epitel hücrelerine göre daha fazla IL-8 cevabı oluşturur (96). Bu abartılmış cevap kısmen NF- κ B'nin inhibitörü olan I κ B ve TLR yolağı gibi negatif sinyal ileticilerinin gelişimsel azlığı ile açıklanabilir (34).

Matriks metalloproteinazlar (MMP), çinko bağımlı endopeptidazlar olup hücre dışı matriksi yıkabilirler. MMP'lerin doku harabiyetinde baskın rol oynadığı gösterilmiştir. NEK'li hastaların bağırsak doku örneklerinde kontrollere göre MMP mRNA ekspresyonu, MMP-1, MMP-3 (stromelisin-1), MMP-7, MMP-12, MMP-24 içeren MMP ailesinin birçok üyesinde artma saptanmıştır. Bundan başka NEK'de önemli araçlar olan IL-1 β ve TNF- α 'nın MMP'ın üretimini uyardığı tespit edilmiştir (34).

Lökotrien B₄'ün nötrofil kemotaksisi ve yapışmasını sağlayarak, LTC₄'ün ise bağırsakta iskemi ve sonuçta bağırsak iltahabına yol açarak NEK patogenezinde etkili oldukları gösterilmiştir (96). LTB₄ nötrofil kemotaksisi ve yapışması için en güçlü iltahabi araçtır. PAF ve lipopolisakkarid ile oluşturulan deneysel NEK modelinde nötrofil aktivasyonunun patogenezde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Deneysel

çalışmalarda PAF uygulandıktan sonra TNF- α , LTB4, LTC4, noradrenalin, prostoglandin ve serbest oksijen radikallerinin artışı gösterilmiştir (70). Bağırsaklarda gelişen iskemi sırasında LTB4 ve kompleman sistemi aracılığı ile n \ddot{u} trofillerin hasarlı b \ddot{u} lgeye g \ddot{u} ç \ddot{u} ve yapışması gerçekleşir. Ayrıca bağırsaklarda iskemi sırasında ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin etkisi ile de n \ddot{u} trofiller aktive olur, hasarlı b \ddot{u} lgeye g \ddot{u}  etmeleri sağlanır. Çeşitli nedenlerle gelişen n \ddot{u} trofil aktivasyonu sonucu miyeloperoksidaz gibi enzimlerin \ddot{u} retimi ve salınımı da artar (85).

2.1.2.7.3 Antienflamatuar cevap ve bağırsak epitel h \ddot{u} crelerinin korunması:

Antienflamatuar sitokinler ve lokal endojen inhibit \ddot{u} rler konağın enflamatuar cevabını d \ddot{u} zenler. Eğer etkisiz kalırlarsa proenflamatuar mediat \ddot{u} rlerin artışı kontrolden çıkabilir ve doku hasarıyla sonuçlanır (34).

2.1.2.7.4 PAF-AH: PAF'ın yıkımından sorumlu olan enzimdir. Hayvan modellerinde rekombinan PAF-AH uygulanması iskemik bağırsak hasarına karşı koruyucu bulunmuştur. PAF-AH aktivitesi deksametazon ile ind \ddot{u} klenir, bu da doğum \ddot{u} ncesi uygulanan glikokortikoidlerin NEK gelişimine karşı koruyucu etkisinin sebebi olabilir.

2.1.2.7.5 İnterl \ddot{u} kin-10 ve interl \ddot{u} kin-11: IL-10 bağırsaktaki en \ddot{u} ncelikli d \ddot{u} zenleyici sitokindir ve primer olarak Th2 h \ddot{u} creleri, monositler ve B h \ddot{u} creleri tarafından sentezlenir (97). IL-10 gibi antienflamatuar aracılarn monon \ddot{u} kleer \ddot{u} retimi yenidoğanda erişkine kıyasla azalmıştır. Preterm yenidoğanlarda yapımı term yenidoğanlara g \ddot{u} re daha azdır (98). Antienflamatuar cevaptaki yetersizliğin proenflamatuar cevabın kontrols \ddot{u} z artışına neden olabileceği ileri s \ddot{u} r \ddot{u} lmektedir. Bu nedenle preterm yenidoğanlar akut enflamatuar durumdan sonra uzun s \ddot{u} re doku hasarına yatkındırlar (34,98,99).

Antienflamatuar cevap olarak IL-10 ve IL-11 artışının bağırsak hasarına karşı koruyucu olduğu g \ddot{u} sterilmiştir. Enflamatuar bağırsak hastalığı olan fare modellerinde, IL-10 \ddot{u} reten Laktobasillus laktis'in mide içine uygulanmasının enflamatuar bağırsak hastalığına karşı koruyucu olduğu tespit edilmiştir (99). Hipoksi ve reperf \ddot{u} zyon hasarına

maruz kalan farelerde intraperitoneal IL-10 enjeksiyonunun lokal ve sistemik enflamatuvar cevabı azalttığı saptanmıştır. Bağırsak doku örneklerinde artmış IL-11 ekspresyonu, azalmış doku hasarı ile birlikte (34).

Anne sütünün NEK gelişimine karşı koruyucu etkisinin diğer bir nedeni IL-10'un varlığı olabilir. Sıçan sütü ile beslenen sıçanlarda bunun yerine yapay inek sütüyle beslenenlere göre NEK sıklığı ve şiddeti azalmıştır ve doku analizlerinde IL-10 ekspresyonu artmış olarak bildirilmiştir (100).

2.1.2.7.6 Büyüme faktörleri: Büyüme faktörleri hücre büyümesinin düzenlenmesinin yanında apoptoz oluşumunu azaltır, hücreleri hasara karşı korur ve onarır. "Transforme edici büyüme faktörü-β" (TGF-β) ile ön tedavi uygulanan bağırsak epitel hücrelerinde IL-8 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Buna rağmen, NEK'li yenidoğanların bağırsak dokusunda TGF-β kontrollere göre farklı bulunmamıştır (40). Mukozal bütünlüğü korumada en önemli büyüme faktörünün EGF olduğu gösterilmiştir. EGF'nin en iyi kanıtlanmış etkilerinden biri gastrointestinal sistemde DNA sentezini uyarmaktır. Ayrıca mukozal bütünlüğün korunması ve besinlerin mukozal büyüme üzerindeki dolaylı etkilerine de aracı olduğu düşünülmektedir (35). EGF intestinal mukoza hücreleri üstünde trofik ve gelişimi artırıcı etkiler yapar (101). Gebelik haftası ilerledikçe amniotik sıvıdaki EGF konsantrasyonu artar (45). EGF'in tükürükteki düzeyi gebelik haftası ile direkt ilişkilidir (45). EGF mamalarda yoktur ancak kolostrumda ve anne sütünde mevcuttur. Bu nedenle de anne sütü ile beslenmenin pretermelerde NEK'e karşı koruyucu olabileceği ileri sürülmektedir (29). Farelerde EGF reseptör inaktivasyonu NEK'e benzeyen bağırsak lezyonlarına neden olur (102). EGF'in klinik kullanımıyla ilgili yapılan çalışmalarda epitelyal rejenerasyonda artış saptanmıştır (47). EGF katkılı sıçan sütüyle beslenen sıçanlarda NEK sıklığı ve şiddetinde azalma görülmüştür. Bu koruyucu etkinin IL-10'un artmış ve IL-18'in azalmış ekspresyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (21).

İnsülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I) de önemli bir büyüme faktörüdür. Anne sütünde de bulunur. İnce bağırsak disakkaridaz aktivitesini ve ileusta bulunan villusların yüksekliğini artırır. NEK gelişimine karşı koruyucu etkisi olduğu düşünülmektedir (35).

2.1.2.7.7 NO: Nitrik oksit sentetaz (NOS)'ın katalizlediği argininin sitriline dönüşme tepkimesinin ürünü olan NO ya da endotel kaynaklı gevşeme faktörü; küçük, stabil olmayan bir serbest radikaldir. NO üretimi NOS'un üç izoformu tarafından düzenlenir. NOS1 (nöronal NOS-nNOS) ve NOS3 (endotelyal NOS-eNOS) kalsiyuma bağlı olarak düşük miktarlarda üretilir; pikomol düzeyinde NO üretirler. Bunun aksine, NOS2 (indüklenebilir NOS-iNOS), çoğunlukla ortamda bulunmaz, fakat inflamatuvar sitokinlerle uyarılırsa makromolar miktarlarda NO üretimine neden olur. Bu üç izoform da gastrointestinal sistem boyunca mevcuttur. NOS aktivitesinin iskemi-reperfüzyon, endotoksin ve PAF tarafından azaltıldığı gösterilmiştir (103). NO, birçok fizyolojik olayda önemli bir sinyal molekülüdür. GİS'te kan akımı düzenleyicisi, motilite düzenleyici ve endotel hücrelerin fonksiyonunda görev yapar. Trombosit agregasyonunu önleyici, mast hücrelerinden mediatörlerin salınımını engelleyici ve makrofajlar üzerinde enflamatuvar ve savunma cevaplarını değiştiren etkileri vardır. NO'nun mukozal bütünlüğün korunması ve bağırsak bariyer fonksiyonunun devamı açısından kritik bir öneme sahip olduğu düşünülmektedir (35,104). Ancak son zamanlarda yapılmış olan çalışmalar sonucunda NO'nun mukoza hücrelerini koruyucu etkisinden şüphe duyulmaya başlanmış, NEK patogenezinde eskiden düşünülen daha paradoksal bir rol oynadığı ileri sürülmüştür (29).

Glutamin enterositler için en önemli besleyici aminoasittir. Büyüme faktörlerinin etkisini artırır ve hücrelerin büyüme ve tamir kapasitelerini olumlu yönde etkiler. Anne sütünde, formül mama ve inek sütünden daha fazla miktarda bulunur. Vücutta endojen olarak sentezlenebildiğinden esansiyel bir aminoasit olarak sınıflandırılmamışsa da, stres altındaki preterm yenidoğanlarda; yetersiz depolar, artmış katabolizma, parenteral beslenme solüsyonlarının glutamin içermemesi nedeniyle düşük olabileceği tahmin edilmektedir. Yapılan çalışmalarda ÇDDA'lı yenidoğanlarda enteral glutamin uygulaması sonucunda sepsis sıklığının azaldığı ve besinlerin daha iyi tolere edildiği gösterilmişse de 2006 yılında yapılmış olan Cochrane çalışmasında glutamin ilavesinin etkisiz olduğu saptanmıştır (35,105). NEK'li yenidoğanlarda plazma glutamin seviyelerini düşük bulmuş çalışmalar yanında, normal olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (35,106).

Sonuç olarak, NEK halen patogenezi tam olarak anlaşılammış kompleks bir sendromdur. Genel görüş, prematürite ile birlikte hipoksik-iskemik hasar, formül mama ile beslenme, beslenme hacminin hızlı arttırılması, bakteriyel kolonizasyon ve sepsis, serbest oksijen radikalleri, aktive lökositler, lökotrienler, PAF, TNF- α gibi inflamatuvar mediatörler aracılığı ile NEK'in geliőtği yönündedir.

2.1.3. Histopatoloji

NEK, yenidoğanlarda barsağın bir veya birden çok bölümünü ya da tamamını tutabilen, en sık koagölasyon nekrozu ve inflamasyonla karakterize bir hastalıktır. En sık ileum (% 86), daha sonra kolon (% 74), daha az olarak da jejunum (% 28) tutulur. Olguların % 44'ünde hem ince barsaklar hem kolon tutulur (3). Barsağın % 75'inden fazlasının tutulduğu NEK tablosu ise "PAN-NEK", "fulminan NEK" ya da "NEC-totalis" olarak isimlendirilir. NEK'te perforasyonlar barsağın daha ziyade antimezenterik yüzünde ve çoğunlukla terminal ileumda olur (3). Makroskopik olarak barsak şiő ve ödemli görünür. Serozal yüzey, fibinöz eksuda nedeniyle kırmızı-gri ya da gangren olmuşsa siyah renktedir. Mikroskopik olarak ise en sık koagölasyon nekrozu ve inflamasyon, daha az olarak da ülserasyon, hemoraji ve pnömotozis intestinalis görülür (5). NEK perforasyona kadar ilerlemezse 3.günden sonra hızlı bir epitelizasyonla iyileőmeye başlar. Fibroblastik proliferasyon 8-9. günde belirginleőir. İyileşme sırasında darlık ortaya çıkabilir (3).

2.1.4.Tanı

2.1.4.1 Klinik Bulgular:

NEK'in klinik bulguları karakteristik olarak postnatal 7-14 günler arasında gözlenirse de bulguların ortaya çıkış zamanı gebelik yaşı ile ters orantılı olarak değişir (6,19) Term bebeklerde yaşamın ilk günlerinde klinik bulgu verirken 30 hafta ve altındaki bebeklerde doğumdan haftalar sonra gözlenebilir (19).

Hastalığın başlangıcında semptomlar özgül olmadığı için erken dönemde sepsisi düşündürür. Sıklıkla saptanan bulgular beslenme intoleransı, mide boşalmasında gecikme, abdominal distansiyon veya hassasiyet, gaitada gizli veya aőıkar kan, letarji, apne, solunum sıkıntısı, veya perfüzyon bozukluğu olarak özetlenebilir. Klinik tablo

gastrointestinal ve sistemik semptomların kombinasyonu şeklindedir, gastrointestinal semptomların ön planda olduğu benign bir hastalık şeklinde seyredebileceği gibi ani bir şekilde dolaşım yetmezliği ile başlayan solunumsal ve metabolik asidoz, yaygın damar içi pıhtılaşma, kanlı gaitanın gözlemlendiği ve multiorgan sistem yetmezliği ile karakterize bir hastalık şeklinde de seyredebilir (1). Kliniği ağır seyreden olgularda intestinal perforasyon ve peritonit şok tablosuna yol açabilir (11).

Yenidoğan servislerinde hastaların beslenme öncesi geri gelenlerinin kontrol edilmesi düzenli olarak yapılan bir işlemdir ve beslenme intoleransının dolaylı ölçüm yollarından biridir. Mideden geri gelenin olağan miktarı tanımlanmamıştır. Ayrıca küçük pretermelerde beslenme intoleransı ve geri gelen arasında kanıtlanmış bir ilişki yoktur. Pratikte sonda az ilerletilmiş olabilir ve midede var olan kalıntıya ulaşmıyor olabilir. Aksine sonda çok ilerletilmiş ve jejunumda olabilir. Geri geleni ölçmek için kullanılan siringa veya sondanın yapısı nedeniyle aspire edilen hacim değişebilir. Aspirasyon sırasında sondanın ucu mide duvarına gelebilir ve bu da var olduğu halde mide içeriğinin alınamamasına neden olabilir (11).

Yenidoğanda dışkıının şeklen incelenmesi NEK'in klinik sınıflamasında yer almamaktadır, ancak klinik tartışmalarda genellikle konu olur. Yapılmış olan bazı çalışmalar sonucunda NEK'li hastaların dışkılamalarının daha geç olduğu görülmüşse de bu hastaların dışkı düzenleriyle ilgili daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır (11). Gaitada gizli kan pozitifliği ise, nazogastrik tüp ile beslenen prematüre bebeklerin %60-75'inde görülebildiği için NEK tanısında yeri kısıtlıdır (37).

Hastalığın şiddeti değişken olduğundan başlangıçta fizik muayenede sadece az miktarda karın gerginliği ve hassasiyet tespit edilebilir (5). Karında gaz oluşumu arttıkça gerginlik artar ve bu da kan akımını olumsuz yönde etkiler. Karın gerginliği ve beslenme intoleransı başlangıç döneminde NEK'in en önemli klinik belirtileridir. Hastalık ilerledikçe karın palpasyonu şiddetli ağrıya neden olur, palpasyon sırasında ele sabit veya hareketli kitle, bağırsak kıvrımları veya karın duvarında krepitasyon gelebilir. Hastaların %4'ünde karın duvarında ödem ve eriteme rastlanır. Bu bulgu daha çok hastalığın geç döneminde ortaya çıkan peritonite bağlıdır (11).

1978 yılında Bell ve ark. NEK kliniği için evreleme sistemi önermişler ve bu evreleme sistemi 1986 yılında Walsh ve Kleigman (11) tarafından yeniden

düzenlenmiştir. Bu sisteme göre yenidoğanlar Evre I (şüpheli), Evre II (kesin), Evre III (ilerlemiş) NEK olarak ayrılmışlardır. NEK'in tedavisi ve yönetimi ile ilgili öneriler bu klinik evrelere göre yapılmaktadır (1,85) (Tablo 1).

<u>Sınıflama</u>	<u>Klinik Bulgular</u>	<u>Radyolojik Bulgular</u>
<u>I (Şüpheli NEK)</u>	Abdominal distansiyon GGK+ Kusma /Gastrik rezidü Apne/letarji	İleus/dilatasyon
<u>II (Kesin NEK)</u>	Evre I'e ek olarak Abdominal hassasiyet ± Metabolik asidoz Trombositopeni	Pnömotosis intestinalis ve/veya Portal vende gaz
<u>III (Ağır NEK)</u>	Evre II'ye ek olarak Hipotansiyon Belirgin asidoz DİK Nötropeni	Evre II'ye ek olarak Pnömoperitoneum

Tablo 1. Nekrotizan Enterokolitte Modifiye Bell Evrelemesi (1,85)

2.1.4.2 Laboratuvar Bulguları

NEK tanısını tek bir laboratuvar testi ile koymak mümkün değildir, ancak hematolojik ve biyokimyasal testler tanıyı desteklemek için kullanılabilirler. Laboratuvar incelemeler inflamatuvar yanıtın aktive olduğunu gösteren özgül olmayan belirteçlerin yanı sıra metabolik ve elektrolit dengesizliğini yansıtır. Genç hücrelerde artışla birlikte lökositöz veya lökopeni; trombositopeni; koagülasyon bozuklukları; hipoglisemi veya hiperglisemi; metabolik asidoz; hiponatremi ve hipopotasemi saptanabilir (1,48).

Beyaz küre sayısı azaldıkça hastalığın prognozunun kötüleştiği gösterilmiştir. Nötropenin olduğu vakalar genellikle gram negatif septisemi vakalarıdır. Nötropenin

sebeplerinin; kemik iliği baskılanması, artmış periferik kullanım ve periton sıvısına kaçış olduğu düşünülmektedir (5,29,59,77).

Preterm yenidoğanlar yaşamın ilk günlerinde plasental yetmezlik, intrauterin büyüme geriliği veya infeksiyon nedenleriyle trombositopeni riski altındadırlar. Üçüncü günden sonra gelişen trombositopeniler ise genellikle sepsis, karaciğer hastalığı, tromboz veya NEK geliştiğine işaret eder. Trombosit sayısının hızlı bir şekilde düşmesi kötü prognoza işaret eder (107). NEK gelişen ÇDDA'lı yenidoğanlarda hastalığın gidişinin şiddetini öngörmeye trombosit sayısı yararlı olabilir (107).

NEK'te metabolik asidoz çok sık görülür. Sepsis ve hipovolemiden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bağırsak nekrozunun özgün bir belirteci değildir (5).

Akut faz reaktanlarından biri olan C-reaktif protein (CRP) seviyesi ile hastalığın ortaya çıkması ve iyileşmesi arasında bir bağ kurulmaya çalışılmıştır. Sonuç olarak CRP'nin hastalığın olduğu vakalarda pozitif olduğu ve olmadığı vakalarda negatif olduğu gösterilmiştir. Şüpheli NEK vakalarında 48 saat içinde CRP seviyesinin pozitifleşmesinin erken bir belirteç olabileceği öne sürülmüştür (108). Seri olarak CRP ölçümünün hastalığın seyri ve tedavinin değerlendirilmesinde faydalı olabileceği ve yüksek CRP değerinin sebat etmesinin komplikasyon gelişimi veya cerrahi girişim gereksinimine işaret ettiği bildirilmiştir (108).

NEK'li hastalarda hiperglisemiye sıklıkla rastlanmaktadır. Kan şekeri yüksekliğine neden olan mekanizmalar tam olarak açıklığa kavuşmamış olmasına rağmen, kan şekeri yüksekliği ile birlikte ölüm oranında artış ve YYBÜ'de kalış süresinin uzadığı görülmüştür. Hastanın klinik durumunun bozulması nedeniyle mi kötü glisemik kontrol olduğu, yoksa kan şekeri yüksekliğinin mi artmış hastalık ve ölüm oranına neden olduğu açık değildir (109). NEK'li hastada kan şekeri yükselmesinin kötü bir prognostik işaret olduğu kabul edilir. Bu hastalarda kan şekerini normal seviyede tutmak için insülin kullanılabilir. Ancak hasta yenidoğanı hipogliseminin zarar verici etkilerinden korumak için çok dikkatli uygulama yapılmalıdır (109).

Hastaların yaklaşık %10-30'unda kan veya peritoneal sıvıda pozitif kültür tespit edilir. Dışkı kültüründe üretilen mikroorganizma, kan veya periton sıvısı kültüründe üreyenle aynı olduğu zaman anlamlı kabul edilmelidir. Sorumlu bakteriler yıllar ve merkezler arasında farklılık göstermesine rağmen, en sık saptanan etkenler, Escherichia

coli, Klebsiella spp, Enterobakter spp, koagülaz negatif stafilokok, Clostridium spp, Pseudomonas aeruginosa ve Candida albicanstır (10,26).

Dışkı örnekleri, redükten madde ve gizli kan açılardan genellikle pozitifdir. Araştırmacılar bunun sebebinin NEK sırasında oluşan mukoza hasarına ikincil olarak gelişen karbonhidrat malabsorbsiyonu olduğunu öne sürmüşlerdir. Bazı araştırmacılar ise kalın bağırsaktaki bakteriyel fermentasyonun lokal D-laktat üretimini arttırdığını D-laktat seviyesini NEK'li yenidoğanların idrarlarında ölçerek göstermişlerdir. NEK'in iyileşmesi veya hastaya antibiyotik verilmesi ile idrar D-laktat seviyesi azalmıştır. Fermentasyonun artması sonucu solunumla atılan hidrojen miktarı da artar. Solunumsal hidrojen testinin negatif olması %99 başarıyla NEK'i ekarte ettirir (5)

Nekrotizan enterokolit ile ilgili yapılmakta olan çalışmalar erken evre NEK hastalarını diğerlerinden ayıracak ve gereksiz tetkik ve tedavilerin önlenmesini sağlayacak bir laboratuvar testi araştırmaktadır. Klinikte halen araştırılmakta olan ancak yaygın kullanıma girmemiş olan belirteçler; 1) idrar D-laktat seviyeleri 2) solukla verilen hidrojen miktarı 3) dışkıda endotoksin miktarının artması 4) plazma intestinal yağ asidi bağlayıcı protein 5) mide bağırsak tonometrisidir (13,59).

2.1.4.3 Radyolojik Bulgular

NEK'in tanısı klinik bulgular yanında radyolojik bulgulara dayanır. Standard ön-arka ve yan veya sol yan dekübit pozisyonda çekilen grafilerin tanısal önemi büyüktür. Tanı koyma dışında tedaviye cevap vermeyen veya klinik olarak kötüleşen olguların hastalık seyrini izlemede ve klinik yaklaşımı belirlemede seri karın filmlerinden yararlanılır (1,29,62).

Erken dönemde abdominal grafi normal olabilir. En sık erken bulgu ise intestinal ileustur. Diğer erken dönem bulguları barsak anslarında dilatasyon, incelme ve hava-sıvı seviyesidir. Bağırsak genişlemesinin derecesi ve bağırsak anslarının dağılımı, hastalığın şiddeti ve ilerleme hızıyla ilgilidir. Bazı vakalarda özgün olmayan bağırsak genişlemesi birkaç saat içinde NEK'i işaret eden klinik belirtilere öncülük eder (5). Eğer artmış gaz görüntüsü sadece kalın bağırsakta görülmekte ise hastanın prognozu hem kalın hem de ince bağırsağında gaz görünen vakalardan daha iyidir (62). Hastalık ilerledikçe intestinal dilatasyon kötüleşir ve pnömatozis intestinalis gelişebilir. Barsak duvarı içinde gaz

görünümü olan pnömatozis intestinalisin görülme sıklığı %19-98 arasında değişir ancak %14 oranında ilerlemiş NEK'li olgularda görülmeyebilir. Aksine bazı yaygın "pnömatozis intestinalis" olan vakaların hafif klinik bulguları vardır ve antibiyotik tedavisine kısa sürede cevap verirler (5). Pnömatozis intestinaliste gaz subseroza ile muskularis tabakası arasındadır ve patojen bakteriler tarafından üretilen hidrojene bağlı olarak oluşur. Pnömatozisin iki radyografik paterni tanımlanmıştır. Kistik patern, submukozadaki hava kabarcıklarından kaynaklanmakta olup, kalın bağırsaktaki fekal materyali taklit edebilir (1). Lineer patern ise hava kabarcıkları tarafından oluşturulup, kistik form ile birlikte veya onun oluşumundan hemen sonra görülür. Küçük baloncuklar muskularis ve subseroza katmanlarında toplanır ve bağırsağın bir segmentinin etrafını saran bir gaz çizgisi oluştururlar (5,62). Lineer form NEK için daha özgüldür (62).

Hastalığın daha da ilerlemesiyle portal venöz gaz gözlenir. Portal venöz gaz karaciğer üzerinde lineer ve dallanma gösteren bir görüntü şeklindedir ve direkt grafinin yanı sıra ultrasonografide de saptanır (1,62). Portal vende gazın varlığı kısa sürer ve bu da sıklığının az (%9-20) rapor edilmesi ile ilgili olabilir (5,110). Yapılmış olan birçok çalışma sonucunda portal venöz gaz bulgusu kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur. Bu hastalarda %38 sıklıkla şiddetli bağırsak nekrozu gelişir ve mortalite %70 civarındadır (5,62,110). Tüm bağırsak katmanlarının tutulumu varlığında portal vende gaz %61 oranında saptanmıştır. Portal vende gaz oluşması, bakteriyel işgal sonucunda bağırsak duvarında gaz birikmesi, bu gazın venöz sisteme yayılması ve portal venin dallarına göçü ile açıklanır. Farklı bir görüş de bu gazın portal venöz sisteme girmiş gaz üreten bakteriler tarafından oluşturulduğu şeklindedir (5,110).

Periton boşluğunda serbest hava bulunması intestinal perforasyon geliştiğini düşündürür ve hastaların %12-30'unda mevcuttur. Sol yan dekübit veya sol yan karın grafilerinde en iyi görünür. Pnömooperitoneumu belirlemek için ayakta direk karın grafisi çekmek gerekli değildir. Yatarak çekilen akciğer grafisinde karın içindeki serbest hava, falsiform ligament, umbilikal arter veya urakus kalıntılarının etrafını sarar. Nadiren görülen bu görüntü "futbol topu işareti" olarak bilinir (5,62). Pnömooperitoneum, çift duvar işareti ile de serbest havayı gösterir. Nekrotizan enterokolitli bazı hastalarda perforasyon ve nekrozun radyolojik bulguları çok açık olmayabilir. Ameliyat sırasında bağırsak delinmesi saptanan vakaların sadece %63'ünde çekilmiş olan grafilerde

pnömoperitoneum görülmüştür ki bu da birçok vakada bağırsak delinmesi olduğu halde serbest hava görülemeyebileceğine işaret etmektedir (5). Ağır solunumsal sorunları nedeniyle mekanik ventilatörde takip edilmekte olan birçok hastada intestinal perforasyon olmadığı halde pnömoperitoneum görülebileceği de akılda tutulmalıdır. Bu vakalarda barotravma, alveoler yırtılmaya ve karına hava yayılmasına neden olmaktadır. Hastanın kliniği, belirti ve bulguları genellikle havanın sebebi ile ilgili yol göstericidir. Eğer şüphe varsa parasentez yapıp alınan sıvı analiz edilebilir. Eğer asit yoksa suda çözünebilir olan kontrast madde ile görüntüleme yapılabilir (5). Hastanın cerrahi tedaviye ihtiyacı olduğuna klinik ve radyolojik bulguların sonucunda varılır. Pnömoperitoneum ve peritonit varlığı sıklıkla ameliyatı gerektirir (110).

Intraperitoneal serbest sıvı ve bağırsak anslarının karnın ortasına doğru yer değiştirmesi, genellikle bağırsak duvarının bütünlüğünün bozulduğuna ve olası bir delinmeye işaret ederler (62). Periton boşluğunda serbest sıvıyı gösteren radyolojik bulgular; 1) gaz görüntüsü olmayan ve gergin karın, 2) karnın ortasında, etrafı opasite ile çevrilmiş gaz dolu bağırsak ansları, 3) karında artmış bulanıklık, sisli görüntü, 4) bağırsak anslarının birbirinden ayrılmasıdır. Asit ve portal vende gaz görülmesi yüksek ölüm oranı ile ilişkili bulgulardır (5).

Sabit genişlemiş bağırsak ansları NEK’li hastalarda bir veya birçok genişlemiş bağırsak ansının 24-36 saat aynı pozisyonda kalmasıdır ve o bölgenin iskemisi nedeniyle oluştuğu düşünülmektedir. Bu hastaların büyük bir kısmında tam kat nekroz geliştiği gözlenmiş olmasına rağmen, bu durum her zaman bağırsak nekrozunu işaret etmeyebilir (5,62).

Ultrasonografi, kontrast radyografi ve manyetik rezonans görüntüleme (MRG), kullanılabilen diğer tanı yöntemleridir. Abdominal ultrasonografi hasta başında uygulanabilmesi, noninvasiv olması nedeniyle tercih edilir. Abdominal ve portal hava (şampanya belirtisi), kitle ve asit varlığını gösterir. Aynı zamanda major splanik vaskülaritenin değerlendirilmesi, çöliak ve süperior mezenterik arterin artmış kan akımının, artmış pik akım hızı tanıda yardımcıdır (111). NEK’li yenidoğanlara cerrahi girişim öncesi ve sonrası yapılan MRG sonucunda hastalarda; sıvı seviyeleri, genişlemiş bağırsak ansları, mezenterik ödem, bağırsak duvarı kalınlaşması ve “köpük benzeri görüntü” tespit edilmiştir. Bu görüntülerin bağırsak nekrozuna işaret ettiği düşünülmüş ve

ameliyatta da bu bölgelerde gerçekten nekroz olduğu görülmüştür. Bu hastalarda MRG sonuçları klinik yaklaşımı değiştirmemiştir. Tüm YYBÜ'leri MRG cihazına sahip olmadığından bu hastaların MRG için yoğun bakım dışında uzun mesafeler gitmeleri sakıncalı bulunmuştur (29).

2.1.5.Tedavi

Hastalığın şiddetinin belirlenmesinde olduğu gibi uygulanacak tedavinin seçiminde de hastaların klinik ve radyolojik bulguları göz önüne alınmakta ve tedavi seçenekleri evrelendirme sistemine paralel olarak değişmektedir. NEK'in tedavisi medikal ve cerrahi tedavi olmak üzere iki şekilde yapılır. NEK şüphesinde veya varlığında tedaviye erken başlanılmalıdır. NEK vakalarının çoğunda medikal tedavi yeterli olmaktadır. Tıbbi tedavinin temel amacı, barsakları dinlendirerek hastalığın ileri evrelere geçişini önlemek, enfeksiyonu kontrol etmek, metabolik dengeyi sağlamaktır (112).

2.1.5.1 Medikal Tedavi:

NEK şüphesi olduğunda tedaviye hızla başlanması durumunda olguların çoğu medikal olarak tedavi edilebilir. Tedavinin ilk adımı hemen enteral beslenmenin kesilmesi ile bağırsak istirahati ve orogastrik tüple dekompresyondur. Umbilikal kateter varsa çekilir. Asit/baz ve elektrolit dengesinin yakın izlemi ile sıvı tedavisi ve kültürler alındıktan sonra geniş spektrumlu parenteral antibiyotik ve parenteral beslenme başlanması tedavi yaklaşımının diğer unsurlarını oluşturur (112). Kan ürünlerinin transfüzyonu gerekli olabilir.

Seri abdominal muayene ve radyolojik değerlendirmelerle yakın izlem önemlidir. Hastadan hangi sıklıkla kan tetkiklerinin ve karın grafilerinin tekrarlanacağını hastanın kliniği belirler (48). Ancak öneriler; hastalarda yakın izlem, sık fizik muayene, 6-8 saatlik aralarla karın grafisi, trombosit, beyaz küre sayımları, kan gazı tetkikleri yapılması yönündedir (1,5,29). Bu durum hastanın durumu stabilleşene veya iyileşme gözlenen kadar devam eder. Klinik parametrelere dayanarak hangi bebeklerin ağır seyredeceği hangi bebeklerin iyileşeceği belirlenemez. Hastanın klinik durumunun bozulması veya karın grafilerinde görüntülerin kötüleşmesi hastanın cerrahi müdahaleye ihtiyacı olduğuna işaret edebilir. Olguların yaklaşık üçte birinde cerrahi girişim gerekir (21,28).

Medikal tedaviye rağmen hastalığın ilerlemesi veya radyolojik bulguların kötüleşmesi ile cerrahi girişimi gerektirir. Eğer radyolojik kanıt yoksa ancak hastanın kliniği kötüleşiyorsa hastaya parasentez uygulanabilir. Parasentez uygulanması için kesin gerekçe yoktur (29). Parasentez sıvısı safralı, dışkılı ise veya sıvının gram boyamasında mikroorganizma görülmüşse bağırsak delinmesi açısından %100 özgündür ve cerrahi tedaviyi gerekli kılar. Parasentez sıvısı normal ise delinme olmadığını göstermez. Klinik veya radyolojik bulgular bağırsak delinmesi veya nekrozunu işaret ediyorsa, hastaya cerrahi girişim yapılmalıdır . Destek tedaviler arasında eğer klinik gereklilik varsa kalp damar sisteminin desteklenmesi (vazopressörler, hacim desteği) ve solunum desteği (oksijen, ventilasyon) önerilir (1).

Nekrotizan enterokolitli yenidoğanlarda antibiyotik uygulamaları; penisilin, amioglikozid ve anaeroblara etkin bir antibiyotiğin birlikte kullanılması şeklindedir. NEK'li yenidoğanlar genellikle 1-2 haftalık olduklarından ve GİS'leri anaerobik mikroorganizmalar ile kolonize olmuş olacağından bu hastalara anaeroblara karşı etkin bir antibiyotik başlanması uygun görülmektedir . Eğer pnömoperitoneum tespit edilmişse veya şüpheli ise anaeroblara karşı etkin antibiyotik tedavisi (klindamisin veya metranidazol) mutlaka başlanmalıdır (1,48). Ancak bu tedavinin yararını ortaya koymuş olan kontrollü çalışma yoktur. Son zamanlarda yapılmış olan çalışmaların sonucunda NEK'li hastaların dışkı ve kan kültürlerinden koagülaz negatif stafilokok üretilmesi sonucunda bazı gruplar vankomisin ve 3. kuşak sefalosporin ile tedavi etmeyi önerirler (5). NEK'li hastalarda mantar sepsisi her zaman akılda tutulmalı ve klinik bulgularında özgül olmayan değişiklikler gelişen hastalarda ampirik olarak mantarlara karşı etkin tedavi başlanmalıdır. Kültür sonuçları tarafından desteklenmedikleri durumlarda vankomisin ve 3. kuşak sefalosporin tedavisi, ikincil mantar çoğalması ve sepsis oranını arttırdıkları için kesilmelidir (5).

Nekrotizan enterokolitli hastalar tekrar beslenmeye başladıklarında dışkıda gizli kan ve redüktan madde açılardan takip edilmeli, bu iki ölçütten herhangi birinde pozitifleşme olması durumunda beslenmeye tekrar ara verilmelidir. Klinik gidiş, laboratuvar ve radyolojik tetkik sonuçları şüpheli NEK (Evre I) ile uyumluysa 3 gün tıbbi tedavi yapılmalı ve her gün klinik durum ve radyolojik tetkik sonuçları ile NEK'in evrelemesinin değişip değişmediği yakından takip edilmelidir. Kesin NEK tanısı (Evre II)

konulmuş ise tıbbi tedaviye 7-14 gün devam edilmeli bu arada şiddetli hastalığa (Evre III) gidiş açısından hasta takip edilmelidir. Eğer şiddetli-ağır NEK tanısı konulmuş ise (Evre III) yoğun kalp damar veya solunum desteği ihtiyacı olabilir. Ayrıca olgu cerrahi girişim ihtiyacı doğabileceği öngörülerek çocuk cerrahisi ile birlikte takip edilmelidir. Cerrahi tedavi görmüş hastalar ameliyattan sonra 2 hafta beslenmemeli ve damardan antibiyotik tedavisi verilmelidir. İki haftadan sonra az miktarda beslenmeye başlanmalı ve beslenme miktarları yavaş yavaş arttırılmalıdır (1,5).

2.1.5.2 Cerrahi Tedavi

Medikal tedaviye rağmen NEK vakalarının %34–50'sinde cerrahi tedaviye ihtiyaç olmaktadır (21). Cerrahi girişim genellikle medikal tedaviye rağmen hastalığın ilerlemesi veya radyolojik kötüleşme ile gerekli olur. Ancak akut başlangıçlı ve ağır seyreden olgularda hastalığın başlangıcında acil operasyon gerekebilir. NEK'li olgularda operasyon gereksiniminin göreceli endikasyonları nonspesifik ve tartışmalıdır. Klinikte bozulma, abdominal duvarda eritem, solunum yetmezliği, genişlemiş bağırsak anslarının devam etmesi, portal venöz gaz, asit, ciddi trombositopeni, nötropeni veya asidoz hastalığın ciddiyetine işaret eder ve cerrahi girişimin rölatif endikasyonlarını oluşturur (1). Tek kesin endikasyon ise, abdominal grafide serbest intraperitoneal hava veya parasentezde safra veya gaita varlığı ile tanı konulabilen intestinal perforasyondur (1,5)

Önceleri bağırsak rezeksiyonu ile ostomi NEK'te standart cerrahi tedavi olarak kabul edilmişken, ağır hasta ÇDDA'lı bebeklerde laparotomi riskli olabileceğinden bu bebeklerde kurtarma tedavisi olarak peritoneal drenaj gündeme gelmiş ve sonrasında, her iki operasyon da NEK tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (29) İki cerrahi yaklaşım karşılaştırıldığında başlangıçta laparotomi lehine daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Ancak peritoneal drenaj yapılan bebeklerin daha küçük ve daha hasta olmasının bu sonuçta rol oynayabileceği düşünülmüş, gruplar karşılaştırılabilir olduğunda laparotomi lehine sonuçlar elde edilmiştir. (113).

2.1.6. Prognoz

YYBÜ'lerindeki gelişmelere rağmen NEK mortalitesi % 20 ile % 50 arasında değişir (24,28) Görülme sıklığına benzer şekilde mortalite de gebelik yaşı ve doğum

ağırlığı ile ters orantılıdır (21). Cerrahi girişime gerek duyulan olgularda mortalite oranı % 50'ye çıkabilir ve en yüksek oran en küçük bebeklerde (64). Yaşayanlar nörogelişimsel, sensörinöral ve fonksiyonel sorunlar açısından risk altındadır (31).

A. Mide bağırsak sorunları: 1. Bağırsak yapışıklıkları: Medikal tedavi sonrası daha sık rastlanmakta ve sıklığı %9-36 arasında değişmektedir. Yapışıklıklar ağır iskemik hasar görmüş bölgenin iyileşmesi sırasında oluşurlar. Yapışıklığın büyüklüğü gelişmiş olan iskemik hasarlı alanın büyüklüğüne ve o bölgeye gelen kan akımının zenginliğine bağlıdır (5).

Yapışıklığın en sık geliştiği bölge (%70) kalın bağırsaktır. İkinci sıklıkta (%15) etkilenen bölge ise ileumun son kısmıdır. Hastalarda genellikle tek bir yapışıklık vardır, cerrahi tedavi almış hastalarda birden fazla yapışıklık da olabilir (5).

Medikal tedavi ile iyileşmiş bir hastada; büyüme geriliği, rektal kanama veya bağırsak tıkanıklığı varsa yapışıklık akla gelmelidir. Eğer baryumlu görüntüleme ile hastada yapışıklık tespit edilirse hasta ameliyat edilmelidir (11).

2. Sindirim bozukluğu ve kısa bağırsak sendromu: Azalmış bağırsak uzunluğu ve mukozal emilim alanı, enzim eksiklikleri, bağırsak hareketlerinin artması, mide asit salınımının artması, bakteriyel aşırı çoğalma, bağırsak geçişinin hızlanması, vitamin B12 ve ileumu çıkarılan olgularda safra tuzları eksikliği sindirim bozukluğu nedenleridir (5).

Kısa bağırsak sendromu cerrahi olarak tedavi edilmiş NEK vakalarının uzun dönemde en ciddi komplikasyonudur ve hastaların %23'ünde görülür (114).

3. Kolestatik karaciğer hastalığı: Direkt hiperbilirubinemi, hepatomegali ve karaciğer enzimlerinin yükselmesi ile kendini gösteren kolestatik karaciğer hastalığı birçok faktör sonucu ortaya çıkmakla birlikte en önemli nedeni uzun süren parenteral beslenmedir. Tedavisi için oral beslenmeye mümkün olduğunca erken başlanmalıdır. Az miktarda oral beslenme safra tuzlarının akışını sağlar ve mukozayı koruyucu ve besleyici etkisi vardır (5).

4. Tekrarlayan nekrotizan enterokolit: NEK cerrahi veya tıbbi tedavi sonrası %4-6 oranında tekrarlayabilir ve bu olguların %70'i medikal yöntemlerle tedavi edilebilir.

B. Nörogelişimsel sorunlar: Hastanede kalış süresi, ilk 1-2 yıl içindeki nörolojik gelişim ile ilişkili bulunmuştur. Bu durumun tıbbi ve sosyal olayların gelişmekte olan beyine etkisi sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir. Şiddetli NEK atağı geçirmiş olan

hastalar nörogelişimsel açıdan yüksek risk altında olduğundan, bu hastalara ilk yılda 4 ayda bir, ikinci yılda ise 6 ayda bir gelişim testi yapılması önerilmektedir (5). Mental ve psikomotor gelişimin özellikle cerrahi olarak tedavi edilen NEK olgularında geri kaldığı bildirilmektedir. Medikal tedavi ile iyileşen NEK'li bebekler benzer yaşta ve NEK olmayan prematüre bebeklere benzer gelişim gösterirken, cerrahi girişim gerektiren olguların nörogelişimsel sonuçlarının daha kötü olması cerrahi gereksinimi olan bebeklerin daha ağır olduğunu ve cerrahi girişimin sağkalımı sağlasa bile morbiditeyi düzeltermeyeceğini düşündürmektedir .

2.1.6.1 Koruyucu Önlemler

NEK'li hastaların uzun süreli sonuçları değerlendirildiğinde en önemli basamak NEK'in önlenmesidir. Etyolojinin tam olarak belirli olmamasının yanısıra tedavi ve korunma yöntemlerinin tartışmalı olması nedeniyle aslında en iyi korunma yöntemi prematüreliliğin önlenmesidir (115).

Koruyucu olarak tartışılan yöntemler: anne sütü ile beslenme, beslenme şemasının değiştirilmesi, prenatal veya postnatal steroidle gastrointestinal maturasyonun desteklenmesi, oral veya iv İg kullanımı, eritropoetin verilmesi, arginin ve glutamin desteği, antibiyotikle bakteriyel kolonizasyonun değiştirilmesi, probiyotik kullanımı, EGF, oral laktoferrin ve aktive protein C verilmesi olarak özetlenebilir (115).

1) Anne sütüyle beslenme: Mama ile karşılaştırıldığında anne sütüyle beslenme NEK riskinde 3 ile 10 kat azalmaya neden olmaktadır (50). Anne sütünün koruyucu etkisi içerdiği antiinflamatuvar faktörler (IL-10), büyüme faktörleri (EGF), eritropoetin, lizozim, immünglobulinler ve bağırsak mikroflorasını hastanın lehine düzelteren pre ve probiyotiklerden kaynaklanmaktadır (50,51). Anne sütü ayrıca asidik bir ortam yaratarak, E.coli'nin üremesini de engellemekte, Lactobacillus bifidus'un çoğalmasına yardım etmektedir. Ayrıca E.coli'nin çoğalması için gerekli olan demiri bağlamaktadır (5). Anne sütü içerdiği avantajlara rağmen NEK vakalarını tamamen ortadan kaldırmamaktadır, sadece anne sütüyle beslenen NEK vakaları da bildirilmektedir (50).

2) Beslenme önerileri: Küçük hacimli beslenmenin belirli bir süreyle artış yapmadan sürdürülmesi olarak tanımlanan trofik beslenme NEK riskini azaltan önemli bir beslenme stratejisidir. Trofik beslenme sindirim hormonlarının salınımını, sindirim

enzimlerinin etkinliğini, bağırsak kan akımını ve hareketlerini artırır. Erken dönemde başlanan trofik beslenen ve beslenmeyen yenidoğanlar karşılaştırıldıklarında, trofik beslenen yenidoğanların beslenmeyi daha iyi karşıladıkları, büyümelerinin daha iyi olduğu ve hastanede yatış sürelerinin azaldığı saptanmıştır (1,5,50). Bunun yanı sıra erken trofik beslenme NEK gelişimine yatkınlık yaratmamaktadır. Beslenme yöntemi intermittan veya devamlı gavaj besleme olarak değişmektedir. Her ikisinin de potansiyel avantajları vardır. Ancak yapılan çalışmalarda birbirlerine üstünlükleri saptanamamıştır (115). Birçok uzman beslenmenin dikkatlice düzenlenmesi ile NEK gelişiminin önlenebileceğini düşünmektedir. Bazı çalışmalar ise beslenmenin artırılma hızının NEK gelişiminde en önemli faktörlerden biri olduğu sonucuna varmışlardır. Ancak çalışmalar hangi beslenme yönteminin en iyisi olduğunu henüz tam olarak ortaya koyamamıştır (1,5,50).

3) Doğum öncesi glukokortikoid verilmesi: Glukokortikoidler, inflamasyonu baskılayarak ve makromoleküllerin mukozal alımını azaltma, aerobik bakterilerle kolonizasyonu azaltma, bakteriyel translokasyonu önleme, laktaz, maltaz, sükröz NA/K-ATPaz gibi enzimlerin aktivitesini artırma gibi özellikleriyle GİS olgunlaşmasını ve fonksiyonlarını etkileyerek tedaviye olumlu etkilerde bulunurlar. Birçok çalışmada doğum öncesi glukokortikoid verilmesini takiben NEK sıklığında azalma olduğu gösterilmiştir. (5,50). Mortalite ve cerrahi endikasyonlarda da azalma saptanmıştır. Doğum öncesi glukokortikoid tedavisi NEK'in önlenmesi açısından basit ve etkili bir tedavidir ve gelişim üzerine potansiyel etkilerini belirlemek açısından daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (50).

4) Oral antibiyotik kullanımı: Profilaktik olarak verilen oral antibiyotiklerin bakteriyel kolonizasyonu engelleyerek NEK'i önleyebileceği düşünülse de bakteriyel direnç gelişimi ve doğal mikroflorayı bozması gibi zararlı etkileri nedeniyle NEK'in engellenmesinde önerilmemektedir (50).

5) Sıvı kısıtlaması: Kısıtlı sıvı verilmesinin doğum sonrası tartı kaybını artırıp NEK gelişme riskini azalttığı gösterilmiştir. Fizyolojik ihtiyacı karşılayıp dehidratasyona neden olmayacak dikkatli bir sıvı kısıtlaması belirgin bir yan etkiye neden olmadan NEK'i ve NEK'e bağlı mortaliteyi azaltmaktadır (50).

6) Probiyotikler: Bakteriyeel çoğalma birçok bağırsak hastalığının gidişini etkileyebildiğinden, probiyotikler ümit vadeden koruyucular olarak ortaya çıkmışlardır. Probiyotikler, yeterli sayıda sindirildiklerinde temel beslenmenin dışında sağlık açısından yararları da olan yaşayan mikroorganizmalardır. Mamaların içinde koruyucu olarak sık kullanılan mikroorganizmalar arasında; Lactobacilli, Bifidobactrium, Sacchoromyces'ler ve daha az olarak da Streptokoklar vardır. Probiyotiklerin prematürelde bağırsakta sağlıklı kolonizasyon oluşturarak NEK gelişimine karşı koruyucu rolleri olabileceği düşünölmektedir. İnvitro ve invivo çalışmalarda probiyotiklerin mukozal Ig A sekresyonu, inflamasyon, epitelyal hücre proliferasyonu ve apoptoz yanında intestinal permeabilite gibi birçok intestinal savunma mekanizmasını regöle edebileceği gösterilmiştir (1,50,115). Klinik deneylerde probiyotiklerin NEK sıklığını ve şiddetini azalttıkları gösterilmiştir. Ancak bu yararlı etkinin klinikte kullanılabilmesi için çalışmalar henüz yeterli değildir. Bazı hastaların probiyotik verilmesi sonrası yaygın hastalığa yakalandıkları da rapor edilmiştir (1,5,50,115).

7) Prebiyotikler: Diğer bir koruyucu yöntem ise, uzun zincirli karbonhidratlar veya müsınler gibi sindirilemeyen besinsel maddeler olarak tanımlanan prebiyotiklerdir. Bunlar yararlı bakterilerin üremesini desteklerler. Çalışmalar sonucunda prebiyotik içeren mamalarla beslenmiş preterm yenidoğanlar, olağan mamalarla beslenmiş yenidoğanlarla karşılaştırıldıklarında hastaların dışkılarında Bifidobacterium'ların arttığı ve hastalık oluşturarak bakterilerin azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca prebiyotiklerle tedavinin konak savunma işlevine de olumlu etkisi olabilir. Prebiyotikler mikroorganizma içermediklerinden, probiyotik tedaviye göre daha az risk taşırlar. Ancak prebiyotikler fazla gaz çıkarma ve ishal gibi yan etkilerle de ilişkili bulunmuşlardır (1,50).

8) Postbiyotikler: Florayı oluşturan bakteriler tarafından üretilen metabolitlerdir. Bir postbiyotik olan bütirat kalın bağırsaktaki yararlı bakteriler tarafından karmaşık karbonhidratların parçalanması sonucu ortaya çıkan kısa zincirli yağ asididir. Bütirat kalın bağırsak hücreleri için önemli enerji kaynağıdır ve bağırsak hücrelerinin büyüme ve farklılaşmasında, inflamasyonun baskılanmasında ve apoptozda rolü vardır. Bütirat ve diğer küçük moleküllu ürünler olağan floranın ve dışarıdan alınan probiyotik ve prebiyotiklerin bazı yararlı etkilerini gösterebilirler ve güvenli bir tedavi seçeneği olabilirler. Bütirat enflamatuvar bağırsak hastalığında sınırlı bir şekilde uygulanmaktadır.

Buna karşın henüz bu maddeler ile yenidoğanlarda yapılmış yeterli sayıda çalışma yoktur (1,50,115).

9) Arginin ve Glutamin desteği: Arginin ve glutaminin antiinflamatuvar aktivitesi yanında intestinal bariyer fonksiyonu, proliferasyon ve iyileşme üzerinde de olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir (48). Arginin NO sentetaz enziminin substratıdır ve bağırsaklarda kan akımı, bariyer fonksiyonu ve doku iyileşmesi üzerinde faydalı etkileri bulunmaktadır. Bu etkilerinin yanında NEK'li bebeklerde plazma arginin düzeylerinin de düşük bulunması nedeniyle arginin desteğinin NEK'i önleyebileceği düşünülmüş ve hayvan modellerinde oral ve intravenöz argininin koruyucu olduğu gösterilmiştir (50,58,106,115). Glutamin ise enterositler için yakıt görevi görür ve intestinal hücre proliferasyonunu ve intestinal bariyerin devamlılığını sağlar (106). Erişkin hastalarda bağırsak permeabilitesini azaltmak, mukozal devamlılığı sağlamak ve enfeksiyöz komplikasyonları azaltmak için kullanılmaktadır. Bu bulgular preterm bebeklerde kullanımının beslenme intoleransı ve NEK insidansını azaltacağını, büyüme ve gelişimi düzelteceğini düşündürmekle birlikte bu sonuçların daha çok çalışma ile desteklenmesi gereklidir (115).

10) Antioksidanların kullanımı: Serbest radikaller NEK dahil olmak üzere birçok yenidoğan hastalık sürecinde saptanmıştır. Antioksidan olan vitamin E'nin lipid peroksidasyonunu ve bağırsaktaki lezyonları azalttığı hipoksik iskemiyle elde edilen hayvan NEK modellerinde gösterilmiştir (69). Ancak antioksidanların tedavi edici etkileri ile ilgili daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır (50).

11) Mamaların asitleştirilmesi: Preterm yenidoğanlar genellikle hipoklorhidri oldukları için enterik gram negatif bakteriler midelerinde kolonize olur. Yapılmış olan bazı çalışmalar sonucunda, yenidoğanlara verilen mamaların asitleştirilmesi (pH:2.5-5.5) ile midede bakteriyel çoğalmasını ve NEK sıklığının azaldığı tespit edilmiştir (5,50).

12) Oral immünglobulinler: Yenidoğanlarda Ig düzeyleri özellikle sekretuar Ig A düzeyleri düşüktür (50,115). Oral Ig verilmesinin gastrointestinal mukozada immünoprotektif etki ile NEK insidansını azaltabileceği düşünülmüş ancak NEK'i önlemede etkin olmadığı görülmüştür (50).

13) Eritropoetin (EPO): Anne sütünde EPO bulunması ve yenidoğanların intestinal villüs enterositlerinde EPO reseptörlerinin ekspresyonu gastrointestinal

sistemin gelişme ve olgunlaşmasında EPO'nun etkili olduğunu düşündürmektedir . Tam olarak absorbe edilmese de EPO enteral veya parenteral olarak uygulandığında fare bağırsağında trofik etki göstermektedir (50). Deneysel bir NEK modelinde EPO uygulanan ratların intestinal doku örneklerinde azalmış nitrik oksit düzeyi saptanmış ve mukozal nekrozun sınırlandığı gözlenmiştir (115). Az sayıda çalışma ile desteklenmekle birlikte bu sonuçlar EPO'nin gelecekte NEK'ten koruyucu önlemler arasında yer alabileceğine dair ümit vermektedir.

14) EGF: EGF etkisini EGF reseptörüne bağlanarak gösteren bir büyüme faktörüdür (44). EGF, amniyotik sıvı, gastrointestinal sekresyonlar, tükürük ve anne sütü gibi birçok vücut sıvısında bulunur. EGF'in bağırsak epitelyal hücrelerinin korunması, gelişimi, hücre proliferasyonunun arttırılması, mukozal enzimlerin uyarılması, gastrik asit sekresyonunun baskılanması gibi birçok etkileri vardır (47,50,115). NEK'li pretermelerde serum ve tükürükte EGF düzeyleri azalmıştır (45,46). NEK'li preterm yenidoğanların bağırsak epitel hücrelerinde immünreaktif EGF reseptörlerinin saptanması NEK tedavisi veya profilaksisi için EGF kullanma ihtimalini arttırmaktadır (46,47,50). NEK'te EGF verilmesinin NEK insidansı ve şiddetini azaltabileceğini gösteren hayvan deneyleri mevcuttur ancak EGF kullanımının yaratabileceği yan etkilerden dolayı hastaların çok dikkatli seçilmeli ve olası yan etkiler açısından risk zarar oranı dikkatli düşünülmelidir. (50,115).

NEK'in engellenmesi ve/veya tedavisinde etkili ve güvenli olabilecek yöntemlerin saptanabilmesi için hastalığın çok daha iyi anlaşılması gerekmektedir. Prematürite ve düşük doğum ağırlığı en önemli risk faktörleri olduğundan bu problemlere yönelik stratejiler belki de NEK'i önlemede etkisi en yüksek olacak yöntemlerdir (1).

2.2. BÜYÜME FAKTÖRLERİ

Gelişmenin olduğu büyüme ve farklılaşma evrelerinde çok sayıda faktör etkili olmakta, hücre büyümesi ve çoğalması olaylarının başlamasında ise büyüme faktörleri temel rolü oynamaktadır. Büyüme faktörleri özellikle deneysel çalışmalarda birçok hastalığın tedavisinde denenmektedir.

Büyüme faktörlerinin biyolojik yarı ömürleri çok kısadır. Bu faktörler, enjekte edildiklerinde hızlı bir şekilde kandan uzaklaştırılır ve doku bariyerlerinden özellikle

kapiler duvarlardan yavaş bir şekilde penetre olurlar (116). Bu nedenlerden dolayı, sistemik uygulama sırasında farmakolojik etkinin oluşabilmesi için yüksek dozda ilaç kullanılmakta ve sonuçta istenmeyen yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Büyüme faktörlerinin in vivo etkinliğini artırmanın ve istenmeyen etkilerinin ortadan kaldırılmasının bir yolu biyoaktif molekülün bir polimerik taşıyıcı sistem içine hapsedilmesi ve belli bir zaman periyodu içinde uzun süreli salınmasının sağlanmasıdır (116).

2.2.1 Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)

EGF birçok memeli türünün değişik doku ve vücut sıvılarında bulunan, 53 aminoasitten oluşmuş mitojenik bir polipeptittir. Subkutan yolla enjekte edildiğinde 48 aminoasitli şekle dönüşmekte ve etken hale gelmektedir. EGF reseptörlerine bağlanarak hücrel olayları düzenler (101). EGF reseptörleri insan vücudunda idrar, tükürük, mide, pankreas sıvısı, serebrospinal sıvı, seminal sıvı, prostat sıvısı, süt ve kanda bulunmaktadır. Amniotik sıvıdaki düzeyleri gebelik haftasıyla doğru orantılı olarak artar (45). EGF ayrıca birçok dokuda, özellikle karaciğer ve plasenta hücrelerinde bulunmaktadır ve epitelial ve mezotelial kökenli hücrelerde mitojenik özelliğe sahiptir (44,45). EGF, embriyogenezi, anjiyogenez, doku ve vasküler sistemlerin onarımında büyük rol oynamaktadır, mukozal bütünlüğü korumada en önemli büyüme faktörünün EGF olduğu gösterilmiştir. (117). EGF'in bağırsak mukozası üzerine trofik, olgunlaştırıcı ve iyileştirici etkileri vardır bunu özellikle GİS'te DNA sentezini uyararak yaptığı düşünülmektedir. (41,101,118). NEK'in patogenezinde ve önlenmesinde etkili olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur (46,47,119). Farelerde yapılan bir çalışmada EGF reseptör inaktivasyonu sonucunda NEK'e benzeyen bağırsak lezyonları saptanmıştır (114). İnsanda EGF'in tedavi edici etkisiyle ilgili bildirilen ilk çalışmada NEK'li bir hastaya EGF infüzyonu uygulandıktan sonra hasarlanmış bağırsağın iyileştiği bildirilmiştir (119). NEK saptanan hastaların tükürük ve serumlarında EGF düzeylerinin aynı gebelik haftasındaki prematürelere göre daha düşük olduğu, idrardaki EGF düzeylerinin ise daha yüksek olduğu bildirilmiştir. (53,54). İdrarda düzeyin yüksek olmasının nedeninin hasarlı mukozadan emilimin fazla olmasıyla ya da EGF sentezinin artması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

2.2.2 Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)

PDGF yara iyileşmesinin her safhasında rol oynar. Yaralanmayı takiben PDGF trombositlerden salınır ve yara sıvısında bulunur. Bu mitogenisiteyi ve nötrofillerin, makrofajların, fibroblastların ve düz kas hücrelerinin yara bölgesine kemotaksisini uyarrır (120). Aynı zamanda makrofajlarda büyüme faktörlerinin üretimini sağlar. TGF- β ve PDGF makrofajlar tarafından dokunun debritletmesini ve granülasyon dokusu oluşmasını artırır (121). PDGF'nin anjiogenez yapma etkisi organa bağlıdır. Kardiyak mikrovasküler hücrelerde vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve VEGF-reseptör-2 üretimini artırarak kardiyak anjiogenezde önemli rol oynar. İskemik dokuda hipoksiyle sinerjik olarak VEGF yapımını artırır. Kan damarlarının maturasyonunda özellikle önemlidir.

2.2.3 Fibroblastik Büyüme Faktörü (FGF)

FGF ailesi 23 üyeden oluşmaktadır. Bunlardan FGF-2, FGF-7 ve FGF-10 kutanöz yara iyileşmesinde rol oynar. Keratinositler, fibroblastlar, endotelial hücreler, düz kas hücreleri, kondrositler ve mast hücreleri tarafından üretilir (122). FGF'ler nöron hücre farklılaşması, anjiogenez, düz kas hücre çoğalması, miyogenez, kıkırdak dokunun oluşması, granülositlerin oluşum ve gelişimi, megakaryosit oluşumu, spermatogenez, keratinosit morfogenez gibi birçok fonksiyona sahiptir (122). FGF-2 ve temel (basic) FGF (bFGF) akut yaralanmada artar, granülasyon dokusu oluşumunda, reepitelizasyonda ve dokunun tekrar yapılandırılmasında rol oynar . In vitro çalışmalar FGF-2'in ekstraselüler matriks elemanlarının sentezlenmesi, reepitelizasyon sırasında keratinosit motilitesinin kontrol edilmesinde rol oynadığını göstermektedir. FGF-2 fibroblastların migrasyonunu ve kollajenaz üretimini artırır.

2.2.4 Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF), özellikle endotel hücreleri için özgül etkilere sahip olan multifonksiyonel bir büyüme faktörü ailesidir (119). Endotel hücrelerinin proliferasyonuna, migrasyonuna ve differensiasyonuna sebep olur (123). VEGF, hem gelişim sırasında, hem de yetişkinde vaskülogenez ve anjiogenez için önemli ve gereklidir (119,15). Bu büyüme faktörü, özellikle damar oluşumunda kritik rol

oyarken, endotel hücrelerinin yaptığı bir çok fonksiyonda da gerekli olduğu görülmüştür. Bunlar embriyogenez, yara iyileşmesi, tümör büyümesi, miyokardial iskemi, oküler neovasküler hastalıklar ve romatoid artrit gibi kronik inflamatuvar hastalıkları da kapsayan fizyolojik ve fizyopatolojik olaylardır. Bu yüzden de son yıllarda ilgi odağı haline gelmekte ve birçok araştırmaya konu olmaktadır (15,16).

Son yıllarda VEGF üzerine yapılan çalışmalar, bu ailenin PDGF süperailisinin önemli bir üyesi olduğunu ortaya koymuştur (124,125). VEGF ailesi VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve plasental büyüme faktörünü içerir.

Endotel hücreleri için önemli bir mitojen olan ve migrasyon etkisine sahip bu faktör, fizyolojik olarak ovulasyondan hemen önce ovaryum folliküllerinden salgılanarak yeni damarların oluşumunu artırırken, ovulasyondan sonra bu salgılama görevini korpus luteum üstlenir. Erken implantasyon döneminde embriyo trofoblastlarınca salgılanır (126). Embriyolojik gelişimin ilk dönemlerinin sonuna doğru VEGF biraz azalırken, organogenez döneminde oldukça yükselir. (127)

VEGF mRNA'sının transkripsiyonu; PDGF-BB (PDGF-BB), keratinosit büyüme faktörü (FGF-7), EGF, TNF- α , transforming büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1) ve interleükin- β 1 gibi çeşitli faktörler tarafından başlatılır. Böylece bu maddelerin mitojenik olmadığı, VEGF salgılanmasına yol açarak mitojeniteyi arttırdıkları gösterilmiştir (128).

Hipoksi, belki de, VEGF ve reseptörlerinin yapımını indükleyerek anjiogenezi başlatan en etkili stimuluslardan biridir. Buna örnek olarak büyüyen tümörlerin hipoksik merkezleri oluşması ve bunu engellemek için tümör hücrelerinden VEGF ekspresyonu ve yeni damar yapımı gösterilebilir. Yine tıkanmış kalp damarlarına bağlı gelişen hipoksi sonrasında da VEGF ekspresyonu artmaktadır. Hipoksinin VEGF'ü artırma mekanizmasının sadece bir kısmı çözülebilmıştır. VEGF yapımı hipoksi tarafından tetiklenirken, CO tarafından da inhibe edilmektedir (129). Hipoksinin yanında azalan pH ve sitokinler ile de VEGF ekspresyonu artmaktadır (127)

2.3. GEN TERAPİSİ

Genler kromozomlarda taşınır ve kalıtımı sağlayan temel fiziksel ve fonksiyonel birimlerdir. Protein üretiminin yöntemini kodlayan spesifik baz sıralarından oluşurlar. Genlerin tanımlanması ve genetik mühendisliğinde kaydedilen önemli gelişmeler

sonucunda hastalıklarla mücadele edebilmek ve korunmak için hatalı genetik yapıyı değiştirme ön plana çıkmıştır (130). Terapötik fayda sağlamak amacıyla bireyin hücrelerine veya dokusuna genetik materyal (hastalıklı mutant allel yerine fonksiyonel allelin) transferine gen terapisi denmektedir (131).

Çeşitli gen terapisi stratejileri geliştirilmiştir ve başarılı bir terapi için gereken ortak temel elemanlar vardır. Bunların en önemlisi hastalığa neden olan genin belirlenmesi ve klonlanmasıdır. Genin tanımlanmasından sonraki aşamada, genin hedeflenen hücrelere nakledilmesi ve orada ekspresyonu, yani kodladığı proteinin üretimi gelir. Gen terapisinin diğer önemli elemanlarıysa tedavi edilmek istenilen hastalığı ve gen nakli yapılacak hücreleri tanımak ve gen naklinin olası yan etkilerini anlamaktır (130).

Yabancı bir DNA'nın konakçı hücreye tanıtımı için iki strateji geliştirilmiştir.

1-DNA'nın kalıcı yerleştirilmesi

2-Geçici transformasyon ve kısa süreli üretim için kullanılması (132).

Genler in vivo veya ex vivo şeklinde sunulabilir. İn vivo tekniğinde genler hedef dokuya direkt ulaştırılır. Ex vivo tekniğinde in vitro transfeksiyon yapılan seçilmiş hücreler izole edilir ve kültür yapıldıktan sonra konakçıya transplante edilir (133).

2.3.1. Gen Terapisi Tipleri

2.3.1.1 Germ hücre gen terapisi

Germ hücre gen terapisinde sperm veya yumurta gibi kök hücrelerin genomlarına fonksiyonel genler yerleştirilerek modifiye edilir. Bu nedenle terapiye bağlı yapılan değişiklik kalıtsal olur ve sonraki jenerasyonlara aktarılır. Bu yeni yaklaşım teorik olarak genetik hastalıkları önleyerek yüksek oranda etkili olacağı düşünölmektedir (133).

2.3.1.2 Somatik gen terapisi

Somatik gen terapisinde terapötik genler hastanın vücut hücrelerine yerleştirilir. Yapılan herhangi bir değişiklik kişiyi etkiler fakat kişi genetik olarak etkilenmediği için kalıtsal değildir (133).

2.3.2. Terapi metodları

Gen terapisinde hedef genleri değiştirmek veya onarmak için birçok yöntem mevcuttur (133):

- Normal bir gen genomda spesifik olmayan lokalizasyona yerleştirilerek fonksiyon görmeyen gen değiştirilir (en sık kullanılan).
- Homolog rekombinasyonla normal gen anormal genle değiştirilir.
- Selektif revers mutasyonla anormal gen onarılır ve gen normal fonksiyonuna kavuşur.
- Özel bir genin düzenlenmesi değiştirilir (gen açılır ya da kapanır) (133).

2.3.3. Gen Transferi Yöntemleri

Hücelere gen eklemenin birkaç yöntemi bulunmaktadır.

1. Transfeksiyon; ıplak DNA molekülleri veya lipozomlarda lipid ile karıştırılmış DNA
2. Enfeksiyon veya transdksiyonla; virüsler gibi istenilen geni taşıyacak ajanlar kullanarak.

2.4. GEN TERAPİSİNDE VEKTÖRLER

Vektör terimi eklenen gen ve onu içeren DNA' yı ve lipozom/virüsü tanımlamak için kullanılan terimdir (134).

2.4.1. Virüsler

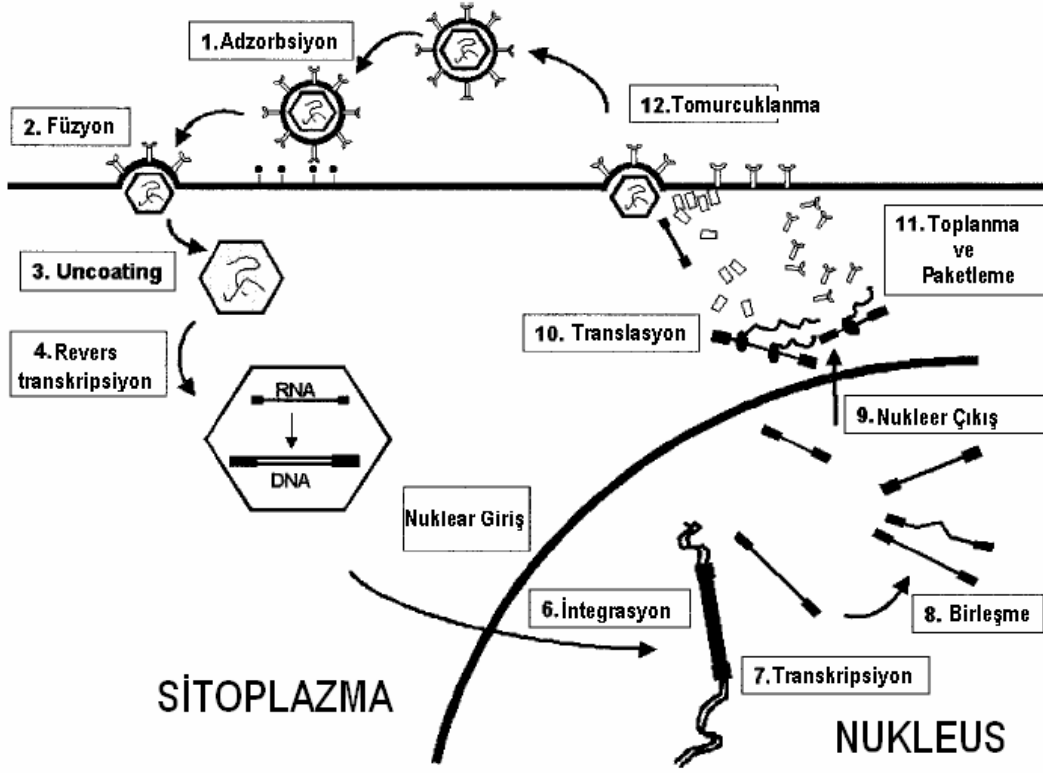
Viral vektörleri kullanarak yapılan gen transferi virüslerin kendi genlerini konakçı hücreye taşıyabilme ve orda kullanabilme esasına dayanır. Gen terapisinde vektörlerinin üretimi virüsün genetik modifikasyonu ile başlar. Bütün virüsler konakılarına bağlanır ve genetik materyalini konakçı hücrenin replikasyon siklusunun bir parçası olacak şekilde yerleştirir. Bu genetik materyalde virüsün daha fazla kopya üretmesi için basit bilgiler bulunur. Bu şekilde vücudun normal üretim mekanizmasını kendisi için kullanmış olur. Virüs retimi devam ettikçe konakçı daha fazla enfekte olur. Replikasyon veya kurulum için gerekli orijinal viral genin silinmesi sonrasında istenilen terapötik genin

yerleştirilmesi izler. Rekombinant virus üretebilme yeteneği paketleme hücreleri adı verilen silinmiş viral genin fonksiyonunu alan özel hücrelerle yerine konur (132).

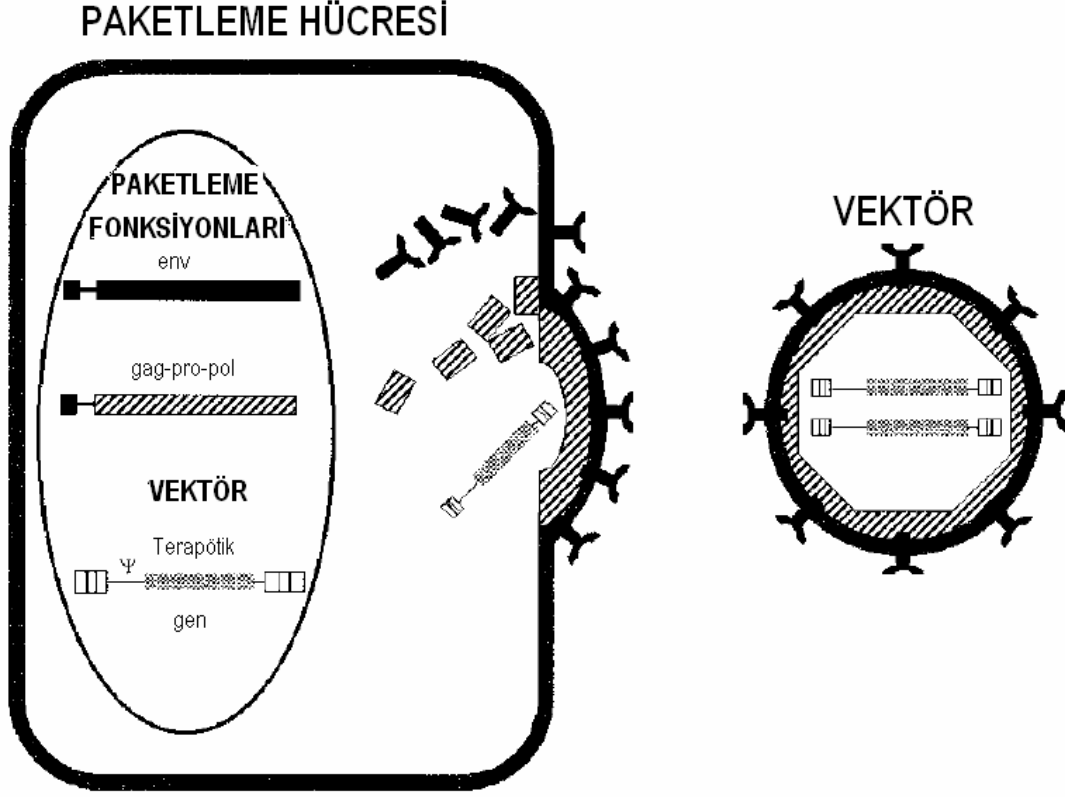
Gen terapisi vektörleri değişik tip virüslerin modifikasyonu ile geliştirilir. Retrovirüsler ve lentivirüsler enfekte olan hücrenin hücre membranından üretilen non-litik replikatörlerdir ve hücreyi sağlam bırakırlar. Litik replikasyon metodunda enfeksiyondan sonra virionların salınmasıyla birlikte hücre çöker. İnsan adenovirüsleri, adeno ilişkili virüsler ve herpes simpleks litik replikatörlerin örnekleridir (132). Retrovirüsler (HIV) fiziksel olarak kendi genomlarını konakçının genomunun içine yerleştirir. Virüs revers transkriptaz enziminin konakçıya yerleştirir; böylelikle kendi RNA'sını ana bilgi kaynağı olarak kullanır. Böylelikle konakçı hücrenin yaşam siklusu boyunca virüs genlerini taşırlar (132).

2.4.1.1 Retrovirüsler

Retroviral vektörler gen transfer teknolojisinin standart olarak kullanılmaktadır (135,136). Diğer gen transfer sistemleriyle karşılaştırıldığı zaman çok çeşitli hücre tipine girebilme, konakçının genomik DNA'sına etkin olarak entegre olabilme ve yüksek miktarda geni çevirebilme yeteneği gibi birçok avantaja sahiptir (137). Retrovirüsün genetik materyalinin konakçıya yerleşebilmesi için kendi RNA molekülünün DNA kopyasını yapması gereklidir. RNA'dan DNA üretilmesine revers transkripsiyon denir. Revers transkriptaz (RT) tek zincirli RNA genomunu çift zincirli lineer DNA'ya kopyalar. RT RNA ve DNA bağımlı DNA polimeraz ve RNA-DNA dublekslerinin RNA zincirleri degrade eden multifonksiyonlu bir enzimdir (138). Nükleusda DNA sentezlendikten sonra büyük konakçı DNA sına yerleştirilmesi işlemi integras enzimi tarafından gerçekleştirilir. Böylelikle konakçı yeni bir gene sahip olur. Konakçı çoğaldıkça ortaya çıkan hücrelerde aynı gene sahip olur (Şekil 2,3) (136,137,138). Retrovirüslerle yapılan gen terapisinin problemlerinden biri integras enziminin geni konakçı genomunda rastgele bir yere yerleştirmesidir. Genetik materyal orijinal genin ortasında bir yere yerleşirse; bu gen bozulur (insersiyonel mutageniz). Eğer bu gen hücre bölünmesini denetleyen bir gen ise ortaya kanser gibi kontrolsüz büyüme durumları çıkar.



Şekil 2. Retrovirüs hayat siklusu (136).



Şekil 3. Viral *gag*, *pro*, *pol* ve *env* (paketleme) genlerini ayrı moleküler yapı içerisinde tutulmakta ve sadece vektör paketlenmektedir (137).

2.4.1.2 Lentiviral Vektörler

Lentiviral vektörler kazanılmış immun yetersizlik sendromunun etiyolojik ajanı olan insan immun yetmezlik virüsünden (HIV-1) kaynaklanır. Bu vektörlerin diğer gen dağıtım sistemlerine göre avantajları mevcuttur. Belirgin klonlama kapasitesi olan (8-9 kb) ve entegre olan bir retrovirüstür. Mevcut çalışmalar doğru regülatuar dizilerin özellikle kontrol bölgesi (locus control region- LCR) kullanıldığında stabil veya hücreye spesifik ekspresyonları olduğunu göstermektedir (140).

2.4.1.3 Adenovirüsler

Adenoviral (Ad) virüsleri, 70–90 nm boyutlarında zarfsız dış protein kabuğunun iç nükleer kor yapıyı sardığı ikosahedral yapıda partiküllerdir. Adenovirüs lineer 30-38 Kbp non-segmente çifte zincirli (ds)DNA genomuna sahiptir. Teorik olarak 30-40 gen taşıyabilir. Memeli hücrelerinde konakçının çoğalma mekanizmasını kullanarak

replikasyon yapar (141). Adenovirüsler genetik materyallerini çift sarmallı DNA formunda taşırlar. Adenovirüslerin genetik materyali konakçının genomuyla birleşmez; geçicidir. DNA molekülü konakçı nükleusunda serbest dolaşır ve bu moleküldeki bilgiler diğer genler gibi RNA'ya ve sonrasında proteine çevrilir. Farklı olarak hücre bölünmesi sırasında bu genler çoğalmaz. Viral gen terapisinde en çok kullanılan vektörlerdir (141).

İn vivo büyük çoğunlukla stabillerdir ve adenoviral vektörler hücreleri in situ enfekte etmek için kullanılabilir. Adenovirüslerin yüksek miktarda üretilebilir olması ve yüksek seviyede heterolog gen sunulabilmesi, gen terapisinin popüler vektörleri haline getirmiştir (142).

Adenovirüsler reseptör aracılı endositoz mekanizmasıyla hücre içine alınır. Genomları nükleusa taşınır ve konakçı genine entegre olmadan (epizomal) replike olurlar. Bunun sonucu olarak insersiyonel mutagenез görülmez. Diğer bir kısıtlama birçok adeno virus vektörünün immunojenik olması ve çevrilen hücreye karşı immun yanıt gelişmesidir. Çevrilen hücreler immun yanıtla parçalanınca, gen ürünlerinin seviyesinde ani bir düşüş görülür. Sekonder immun yanıt nedeniyle adenoviral vektörlerle tekrarlayan gen transferi başarısız olmaktadır (143).

2.4.1.4 Adeno-İlişkili Virüsler (AİV)

Parvovirus ailesinden tek sarmallı DNA'lı küçük virüslerdir. Rekombinant AİV viral gen taşımaz ve genoma integre olmaz; terminal zonlarından birleşir ve sirküler; epizomal form oluşturur. Bunun sonucu olarak uzun dönem gen ekspresyonu görülür. Az miktarda DNA içerdiği için gen taşıma kapasitesi azdır ve üretilmesi zordur. Adenovirüslere göre konakçıda immun yanıt gelişimi azdır. AİV'lerin çoğalamayan hücreleri enfekte edebilmesi önemli bir avantajdır (144).

2.4.1.5 Protein Zarflı Viral Vektörlerin Psödotiendirilmesi

Virüslerin etkin olarak enfekte edebildikleri doğal konakçı hücreler bulunmaktadır. Retrovirüslerin adenovirüslere göre enfekte edebildikleri konakçı çeşidi daha sınırlıdır. Bazı hücreler ise viral enfeksiyonlara dirençlidir. Duyarlı hücreye tutunma ve giriş virüsün yüzeyinde ki protein zarf sayesinde gerçekleştirilir. Spesifik protein reseptörü sayesinde viral proteinde yapısal değişiklik meydana gelir ve hücreye giriş

sağlanır. Konakçı enfeksiyonun meydana gelmesi için virüs yüzey proteini ile hücre yüzey proteinin uygun etkileşimi gerekmektedir. Gen terapisi için vektörün hedef çeşitliliği artırıp azaltılmak istenebilir; bu vektörün zarf proteininin başka virüslere ait zarf proteinleriyle ya da şimerik proteinlerle değiştirilmesiyle gerçekleştirilebilir. Protein kılıfları değiştirilen virüslere psödoprotein virüs denir (144).

2.4.2. Viral Olmayan Metodlar

DNA dağıtımının en basit yöntemi plazmid DNA ekspresyon vektörlerinin ökaryotik promotorlar tarafından alınmasıdır.

Viral olmayan DNA dağıtım vektörleri iki ana tipte sınıflanabilir.

1. Polimerik dağıtım sistemleri (DNA polimer kompleksleri)

Polimerik dağıtım sistemleri, pozitif yüklü kompleksin anyonik DNA ile elektrostatik etkileşmesi sonucu hücresel uptake'ine dayanır. Bu kompleksin negatif yüklü hücre yüzeyiyle etkileşmesi manipüle edilerek DNA uptake artırılabilir.

2. Lipozomal dağıtım sistemleri (DNA lipozomal kompleksleri)

Lipozomlar fosfolipid çift katman ile sarılmış sıvı kompartmanından oluşan veziküllerdir. DNA sıvı kompartmanın içinde veya fosfolipid lamelle kompleks halde tutulur. Lipozom dağıtım sistemleri istenilen büyüklük, yüzey yükü, bileşim ve morfolojiye ulaştırılabilir. Viral olmayan transfeksiyon etkinliği viral vektörlere oranla önemli oranda azdır. Diğer bir dezavantajı serum varlığında hızlı inaktivasyonudur. Viral olmayan vektörlerin ana avantajı immun yanıt oluşturmadığı için güvenli uygulanabilmesidir (142).

2.4.2.1. Çıplak DNA

Viral olmayan transfeksiyonun en basit metodudur. İntramusküler plazmide bağlı çıplak DNA enjeksiyonları denenmekte ve başarılı sonuçlar bildirilmektedir. Fakat diğer metodlara göre gen ekspresyonu çok az olmaktadır (18).

2.4.2.2. Oligonükleotidler

Oligonükleotidler kısa zincirli DNA segmentleridir. Sentetik oligonükleotidler gen terapisinde hastalıktan sorumlu genleri inaktive etmek için kullanılmaktadır.

Hücre internalizasyonu ile selektif olarak tek bir proteinin üretilmesini engelleme yöntemleri. Bunun için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Hatalı genin transkripsiyonunu bozmak için hedef gene spesifik antisens kullanmak bir stratejidir. Antisens uygulamalarında oligonükleotidler mRNA veya pre-mRNA ile etkileşerek dupleks yapar ve protein translasyonu engellenir. Diğer bir yöntem siRNA adı verilen küçük RNA molekülleri kullanarak hücrenin, hatalı genin mRNA transkriptinde yer alan özel dizinlerini ayırmasıdır. Bu sayede hatalı genin translasyonu ve böylelikle genin ekspresyonu durur (18).

2.4.2.3. Lipopleksler ve polipleksler

Yeni DNA'nın hücre içine ulaşmasını sağlamak için, DNA'nın hasar görmesi önlenmeli ve hücre içerisine girmesi kolaylaştırılmalıdır. Bu aşamada DNA'nın indirgenmesini önlemek için yeni moleküller lipopleksler ve polipleksler üretilmiştir. Plazmid DNA'sı lipidlerle kaplanarak miçel veya lipozomlar gibi organize bir yapı oluşabilir. Bu organize yapı DNA ile kompleks oluşturursa lipopleks adı verilir. DNA'lı polimer kompleksleri polipleks olarak adlandırılır (145).

2.4.3. Plazmidler

Plazmidler spesifik proteinleri kodlayan transgenleri içeren yüksek molekül ağırlıklı çift sarmallı DNA'lardır. Moleküler düzeyde plazmidler ön-ilaç olarak kabul edilebilir; hücre içerisine alınmasıyla DNA transkripsiyon ve translasyon aletlerini terapötik proteinin sentezlenmesinde kullanır. Gen terapisinde plazmid DNA'sını kullanarak, kalıtsal olarak belirli bir proteini üretemeyen hücre, programlanmış transgenler aracılığıyla bu proteini sentezleyebilir. Plazmidler genetik hataları düzeltmek için kullanılabilir. Plazmid molekülünün etkin olabilmesi için sitoplazmaya girdikten sonra nükleusa girmesi gerekir. Nükleusa giriş nükleer porlardan sağlanır ve oldukça zor işlemdir. Hastalık tedavisi yanında plazmidler genetik immunizasyon için aşı olarak kullanılabilir. Enhancer'lar plazmid DNA'sında ilgili genin üretimini 100 kata kadar artırabilen bölgelerdir. Transkripsiyon etkinliği uygun enhancer ile artırılabilir (18).

3.MATERYAL METOD

3.1.Deney Hayvanları

Bu deneysel çalışma, Yeditepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu ve İstanbul Tıp Fakültesi Merkezi Etik kurul onayı alınarak, İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Bölümü, İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı ve Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Çalışmamızda, İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen 10-15 gram ağırlığında, sağlıklı, 24 adet Wistar-Albino sıçan yavrusu kullanıldı. Bütün hayvanlar 22°C oda sıcaklığında anne yanında kafeslerde tutuldu. Günde 2 kez kafes bakımları yapıldı. Sıçanlar her grupta 8 sıçan olacak şekilde 3 gruba randomize edildi;

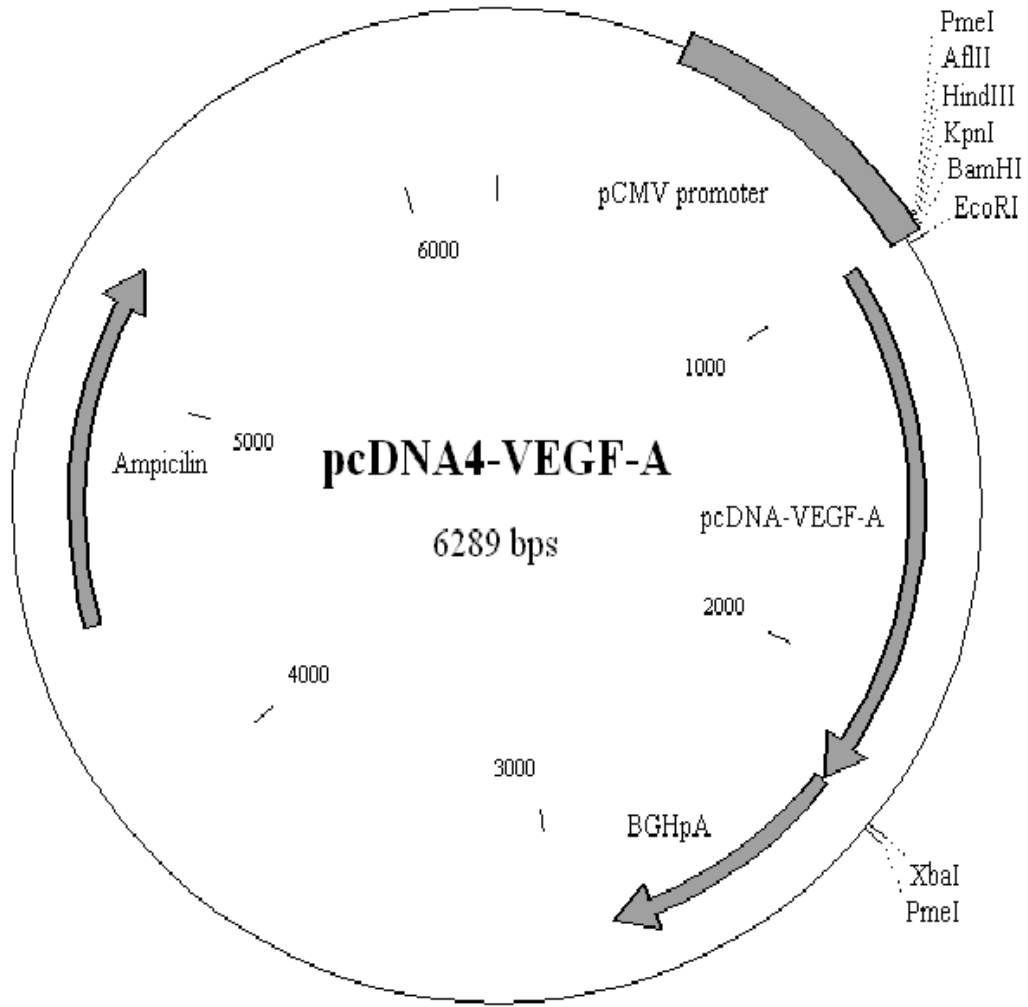
Grup 1 (n=8) (Sham grubu): Herhangi bir işlem yapılmayan normal yeni doğan ratlar

Grup 2 (n=8): NEK oluşturulan ve plasmid verilen grup

Grup 3 (n=8): NEK oluşturulan ve plazmide bağlı lokal VEGF geni verilen grup

3.2. Plazmid Hazırlanması

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Bölümünde kültür yapılmış hücrelerden, üretici firmanın (Qiagen Co) tavsiyesiyle, total RNA purifikasyon kiti kullanarak total RNA izole edildi. Revers transkripsiyondan sonra 5' ve 3' uçlarında kısıtlama bölgesi içeren oligonükleotidlere PCR yapıldı. PCR fragmanları %1'lik agarose jelden keserek ayrıldı. Kesilmiş agarose jelden, jel ayrıştırma kiti ile DNA ayrıştırıldı. 50 ng'lık DNA vektörü ve 1 µl'lik PCR ürünü, 1 ml (3u/µl) T4 DNA ligaz içeren 2x T4 DNA ligaz tamponla 4°C'de bir gece inkübe edildi. Ligasyon reaksiyonun 2µl 'si ve DH5 alfa uyumlu hücrelerin 100 µl'sine ısı-şok transformasyonu uygulandı ve 100 mg/ ml ampisilin içeren agar plakalara yayıldı. PCR test edildi ve ardıştırma (Refgen Co, Turkey) ile doğrulandı. Plakalar bir gece 37°C'de inkübe edildi. Plazmidler çoğaltıldı. Endofree Plazmid kit (Qiagen) kullanılarak saflaştırıldı. İnsan VEGF cDNA 'sı taşıyan plazmidler üretildi. Kontrol amaçlı boş pcDNA3.1 plazmid üretildi (Şekil 4).



Şekil 4: VEGF plazmide klonlanma aşamasının şematik görünümü

3.3. Cerrahi Teknik ve Tedavi

Çalışmamızda 3 adet gebe Wistar Albino türü rat spontan olarak doğurtulduktan sonra anne sütünün koruyucu etkisini engellemek üzere yavrular annelerinden hemen ayrılarak 37°C de nemli küvöze alındı.(Resim 1) Yavru ratlar kontrol grubu, NEK grubu ve VEGF ile tedavi edilen NEK grubu olarak 3 gruba ayrıldı. 2 ve 3 gruptaki yavru ratlar NEK oluşturmak amacı ile 0.2 mL özel rodent bir mama (15 g Similac 60/40 [Ross Pediatrics, Columbus, Ohio]) ile günde 3 kez beslendi daha sonra literatürde belirtildiği şekilde 10 dak %100 CO2 inhalasyonu uygulandı (Resim 2), ardından 5 dk +4°C soğukta bırakıldı ve günde 2 kez 5 dakika %97 O2 verildi. Her gün ratların kiloları ölçüldü ve

tartı kayıpları kayıt edildi. 3. gruptaki ratlara intraperitoneal plazmide klonlanmış VEGF geni 4 gün subkutan olarak verildi, ratların klinik bulgularındaki ve genel durumlarındaki iyileşme klinik skorlama yapılarak kaydedildi. Ratların 4 gün sonra karınları açıldı, orta hat laparotomiye takiben terminal ileumun 2 cm'lik parçası histopatolojik ve biyokimyasal inceleme için ayrıldıktan sonra ratlar sakrifiye edildi (Resim 3,4).



Resim 1: Yenidoğan ratların genel görünüşü



Resim 2: CO2 inhalasyonu için dizayn edilmiş küvöz ve düzenek görülmekte



Resim 3: Cerrahi işlem sonrası yenidoğanın i organlarının grn

3.4. Histopatolojik İnceleme

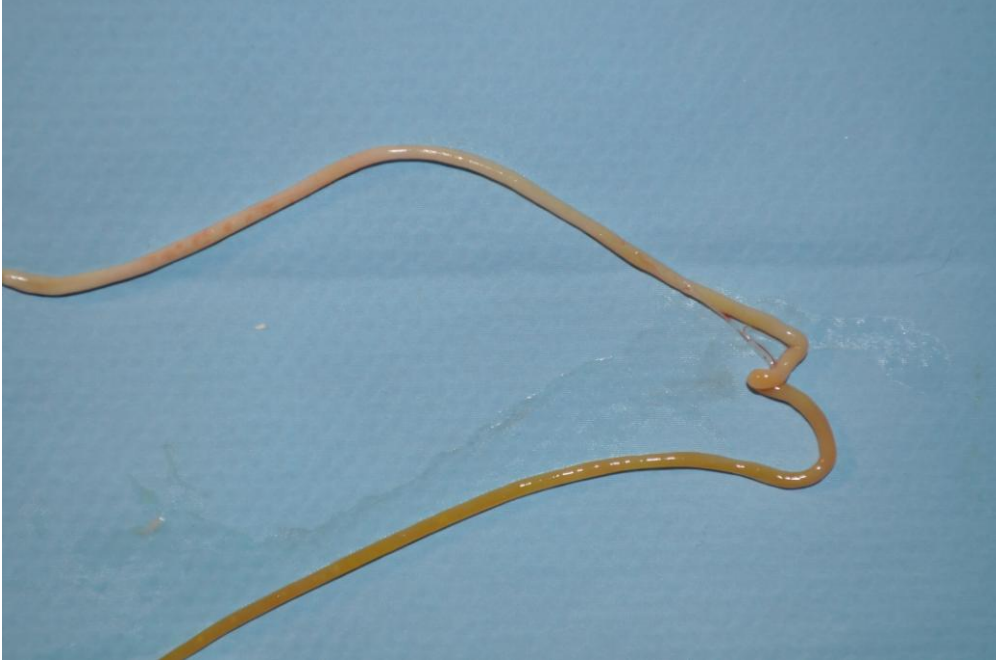
Doku parçaları 24 saat %10'luk formaldehit solüsyonu içinde sabitlendikten sonra

parafin bloklar hazırlandı. Parafinlenmiş doku bloklarından, 4 µm kalınlığında transvers kesitler hazırlandı. Kesitler hematoksilin-eozin ile boyanıp ışık mikroskopunda (Olympus, BX51, Japan) x20, x40 ve x100 büyütme ile değerlendirildi, ışık mikroskopuna bağlı olan Olympus marka fotoğraf makinesi ile kesitler fotoğraflandı. Dokuların histopatolojik incelemesi, örneklerin hangi gruba ait olduğunu bilmeyen (kör) deneyimli bir patolog tarafından yapıldı. Anastomoz hattındaki değişiklikler ve iyileşmenin değerlendirilmesi için kullanılan parametreler ve histolojik evreleme skalası aşağıda yer almaktadır;

1. İnflamatuar yanıt
2. Fibroblast proliferasyonu
3. Neovaskülarizasyon (Anjiogenez)
4. Kollajen birikimi
5. Epitelizasyon

Histolojik evrelemeleme skalası;

- 0: Değişiklik yok
- 1: Hafif derecede
- 2: Orta derece
- 3: Yoğun



Resim 4: Histopatolojik ve biyokimyasal inceleme için alınan ince barsağın görünümü, (NEK oluşturulan segment görülmektedir)

3.5.Biyokimyasal İnceleme

Bütün biyokimyasal parametrelere Cerrahpaşa Biyokimya Anabilim Dalında bu konuyla ilgili uzman tarafından bakıldı. Terminal ileumdan doku biopsisi alındıktan sonra hassas terazide tartıldı ve serum fizyolojik solüsyonu içerisinde Potter tipi cam homojenizatör (Heidolph-RZR 2021, Almanya) kullanılarak % 20 homojenizata (%20 g /ml) homojenize edildi. Homojenizatlar 1500 d /dak hızda 15 dakika santrifüje edildikten sonra süpernatantlar 10-18 saat süresince eşit oranda hidroklorik asit eklenerek hidrolize edildi.

VEGF ölçümünde D-diaclone antipolyclonal animal VEGF kaplı plaklar kullanıldı. Bu testler otomatik Best 2000 (Biokit) mikroelisa ile yapıldı. VEGF için dokudaki normal değer < 50 pg/ml/mg doku olarak alındı.

Oksidatif hasarı değerlendirmek için alınan doku örnekleri küçük parçalara ayrıldıktan sonra 1/5 (W/V) fosfat ile tamponlanmış saline solüsyonuyla homojenize edildi. Dokuda oksidatif hasarı değerlendirmek amacıyla tüm gruplarda malondialdehit dehidrogenaz (MDA) ve nitric oksit (NO) düzeylerine bakıldı.

MDA ölçümü tribütirik asid metodu ile yapıldı. PH 2.0 da ve 1 mikromol/L demirsulfat ilave edildi. Absorbsiyon 535 nm dalga boyunda ölçüldü. MDA nın dokudaki normal değer aralığı < 1,0 mikromol/L/mg doku olarak alındı.

NO ölçümü için kalorimetrik metod kullanıldı. (Boehringer Mannheim kit) (Kat no: 175 6281). NO için dokudaki normal değer <0,5 pg/ml/mg doku olarak alındı.

Dokudaki (Homojenattaki) inflamasyonu belirlemek için TNF alfa, IL-6 ve miyeloperoksidaz (MPO) düzeyleri ELİSA (Quantikine-Sensitivity-Human by RPD Systems USA) metodu ile ölçüldü. IL-6 için dokudaki normal değer <3,0 pg/ml/mg doku olarak alındı. TNF alfa için dokudaki normal değer < 3,5 ng/ml/ mg doku olarak alındı. Doku MPO aktivitesi, Kruidener ve arkadaşlarının kullandığı yöntem ile belirlendi ve U/mg protein olarak rapor edildi (146). Doku apoptozis düzeylerini saptamak için dokuda caspase 3 aktivitesi çalışıldı. Doku caspase 3 aktivitesi Jonges ve arkadaşlarının kullandığı yöntemle ölçüldü ve pmolAMC/dk/mg protein olarak rapor edildi (147)

3.6. İstatistiksel Değerlendirme

Ölçümlere ait tanımlayıcı istatistikler ortalama \pm standart sapma (sd) olarak verildi. Non-parametrik testler değerlendirildi. Gruplar arasındaki fark Kruskal-Wallis ile araştırıldı. Gruplar arasında farklılık olduğu görülen değerlere ($p<0.05$) kendi aralarında değerlendirilmek üzere Mann-Whitney U testi uygulandı. Hesaplamalarda SPSS for Windows sürüm 16.0 (Statistical Package for Social Sciences, inc.) kullanıldı. $P<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

NEK oluşturulduktan sonra deney hayvanları içerisinde 1 adet mortalite görüldü. Bu yavru rat yerine yenisi kondu. Grup 2 ve 3'teki ratların hepsinde histopatolojik olarak NEK bulguları saptandı.

4.1 Doku VEGF ve VEGF Reseptör Düzeyi

Dokuda çalışılan 3 farklı VEGF reseptörü mevcuttu. Reseptör düzeyleri ayrı ayrı gruplar arasında karşılaştırıldı. Yapılan karşılaştırmada grup 2 ile grup 3 (VEGF tedavisi yapılan grup) arasında her 3 VEGF reseptörü açısından da istatistiksel olarak anlamlı fark

tespit edildi. ($p = 0.001$). Bu 3 reseptörün doku düzeyleri grup 3' te grup 1 ye göre yüksek olmasına yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlı idi ($p < 0,05$). Tablo 2 ve 3 de VEGF ve VEGF reseptör düzeylerinin istatistiksel değerlendirmesi sunulmuştur .

Gruplar	Grup1 (ortalama±sd)	Grup2 (ortalama±sd)	Grup3 (ortalama±sd)
VEGF (pg/ml)	51,42±4,51	23,70±5,57	94,82±4,53
VEGFR1 (pg/ml)	531,66±34,47	633,78±42,29	953,43±27,78
VEGFR2 (pg/ml)	4009,33±271,25	3315,62±801,21	7377,96±1313,74

Tablo 2: Grupların VEGF düzeylerinin ortalama ve standart sapmaları

Gruplar	Grup2 (ortalama±sd)	Grup3 ortalama±sd)	p
VEGF (pg/ml)	23,70±5,57	94,82±4,53	0.001
VEGFR1 (pg/ml)	633,78±42,29	953,43±27,78	0.001
VEGFR2 (pg/ml)	3315,62±801,21	7377,96±1313,74	0.001

Tablo 3: Grup 2 ve 3'ün VEGF düzeylerinin karşılaştırılması

4.2 Doku Oksidatif Hasar Parametreleri

Grupların MDA ve NO düzeylerinin istatistiksel karşılaştırılması tablo 4 ve 5 de gösterilmiştir. Yapılan değerlendirmede Grup 1 (sham grubu) ile diğer gruplar arasında oksidatif hasar parametreleri açısından istatistik olarak anlamlı fark vardı. MDA düzeyleri değerlendirildiğinde Grup 2'de Grup 3'e göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p = 0.001$). NO düzeyleri de grup 2'de 3'e göre daha yüksekti ve fark istatistiksel olarak anlamlı idi. ($p = 0,001$). (tablo 4 ve 5)

	Grup 1	Grup 2	Grup 3
MDA (nmol/ml)	0,87±1,26	3,6700±0,17	1,53±0,32
NO (mmol)	93,68±2,57	286,37±19,45	144,00±20,52

Tablo 4: Grupların oksidatif hasar parametrelerinin ortalama ve standart sapmaları

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	P Grup 1-2	P Grup 1-3	P Grup 2-3
MDA (nmol/ml)	0,87±0,26	3,67±0,17	1,53±0,32	0.01	0.01	0.001
NO (mmol)	93,68±2,57	286,37±19,45	144,00±20,52	0.001	0.001	0.001

Tablo 5: Grupların oksidatif hasar parametrelerinin karşılaştırılması

4.3 Doku İnflamatuvar Parametreleri

TNF alfa, IL-6 ve MPO düzeyleri grup 2 ve 3'te sham grubuna göre anlamlı olarak farklı idi. TNF alfa ve IL-6'nın grup 2'de 3'e göre daha yüksek olduğu, MPO düzeylerinin ise grup 3'te 2'ye göre daha yüksek olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi (sırası ile p=0,001; p=0,01). Tablo 6 ve 7'de de grupların inflamasyon düzeylerinin istatistik sonuçları sunulmuştur.

	Grup 1	Grup 2	Grup 3
IL-6 (pg/ml)	0,20±0,46	0,78±0,08	0,60±0,079
TNF-a (pg/ml)	0,2175±,005	0,64±0,10	0,38±0,04
MPO (U/mgprotein)	0,13±0,01	0,33±0,04	0,48±0,06

Tablo 6: Grupların inflamatuvar parametrelerinin ortalama ve standart sapmaları

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	P Grup 1-2	P Grup 1-3	P Grup 2-3
IL-6 (pg/ml)	0,20±0,04	0,78±0,08	0,60±0,07	0.001	0.001	0.001
TNF-a (pg/ml)	0,21±0,05	0,64±0,10	0,38±0,04	0.001	0.001	0.001
MPO (U/mgprotein)	0,13±0,01	0,33±0,04	0,48±0,06	0.001	0.001	0.01

Tablo 7: Grupların inflamatuvar parametrelerinin karşılaştırılması

4.4 Biyokimyasal Apoptozis Düzeyi Sonuçları

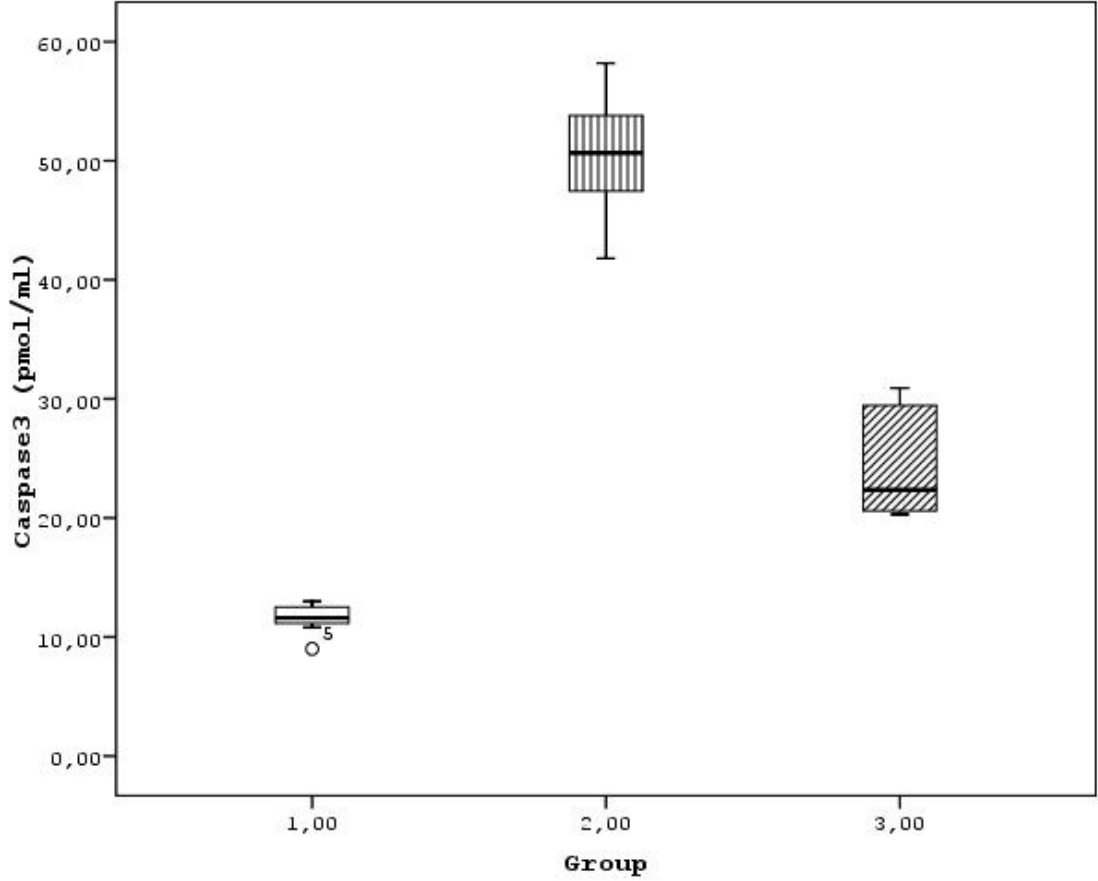
Apoptozis dokuda Caspase 3 aktivitesine bakılarak değerlendirildi. Grup 3'te caspase 3 düzeyi grup 2'ye göre anlamlı olarak farklı idi ($p=0,001$). Grup 2'de grup 3'e göre daha yüksek olan caspase aktivitesi apoptozisin grup 2 'de daha fazla olduğunu göstermektedir (Tablo 8,9 ; Şekil5).

	Grup 1	Grup 2	Grup 3
Caspase3 (pmol/ml)	11,56±1,25	50,47±5,19	24,50±4,63

Tablo 8: Grupların caspase3 düzeylerinin ortalama ve standart sapmaları

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	P Grup 1-2	P Grup 1-3	P Grup 2-3
Caspase3 (pmol/ml)	11,56±1,25	50,47±5,19	24,50±4,63	0.001	0.001	0.001

Tablo 9: Grupların caspase 3 düzeylerinin karşılaştırılması



Şekil 5 . Caspase 3 aktivitelerinin gruplara göre karşılaştırılması

4.5 Histopatolojik Değerlendirme

Dokunun histopatolojik incelemesinde inflamasyon, epitelizasyon, iskemi, anjiogenez düzeyleri değerlendirildi (Tablo 10). Anjiogenez grup 3'te grup 2'ye göre daha iyi düzeydeydi ve istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttu.($p=0.001$) Epitelizasyonun yine grup 3'te grup 2'ye göre anlamlı olarak farklı olduğu tespit edildi ($p=0.001$) (Şekil 6). İnflamasyon düzeyleri açısından yapılan değerlendirmede ise grup 2 ile grup 3 arasında fark tespit edilmedi . Grupların histopatolojik değerlendirmesi tablo 10 ve 11'de sunulmuştur.Histopatolojik incelemede göze çarpan en önemli bulgu barsakta villüslerde NEK sonrası atrofinin meydana gelmesi idi. Villüs boylarında kısalma mevcuttu. (Resim 6). Gen tedavisi grubunda ise villüs boyları normale yakındı ve yapılan istatistiksel değerlendirmede villüs boyları grup 3'te 2'ye göre anlamlı olarak

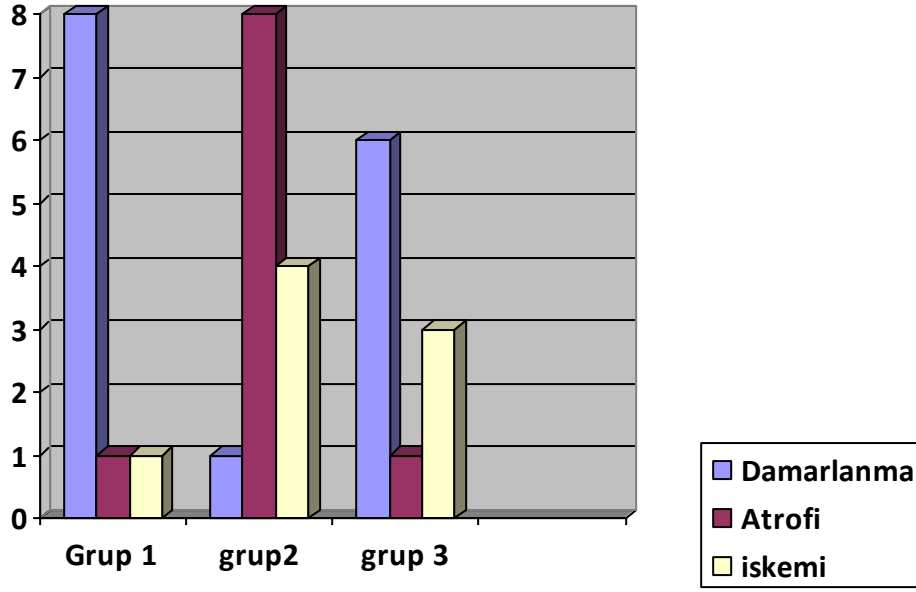
artmıştı (Resim 7). Sham grubunun histopatolojik incelemesinde barsak villüsleri normal yapıda idi (Resim 5).

İntestinal doku	Group		
	1,00	2,00	3,00
Atrofi 0	8	0	8
1	0	8	0
Ödem 0	8	0	8
1	0	8	0
Damar lanma 0	0	7	2
1	8	1	6
İskemi 0	8	4	5
1	0	4	3
İnfilamasyon 0	8	6	7
1	0	2	1

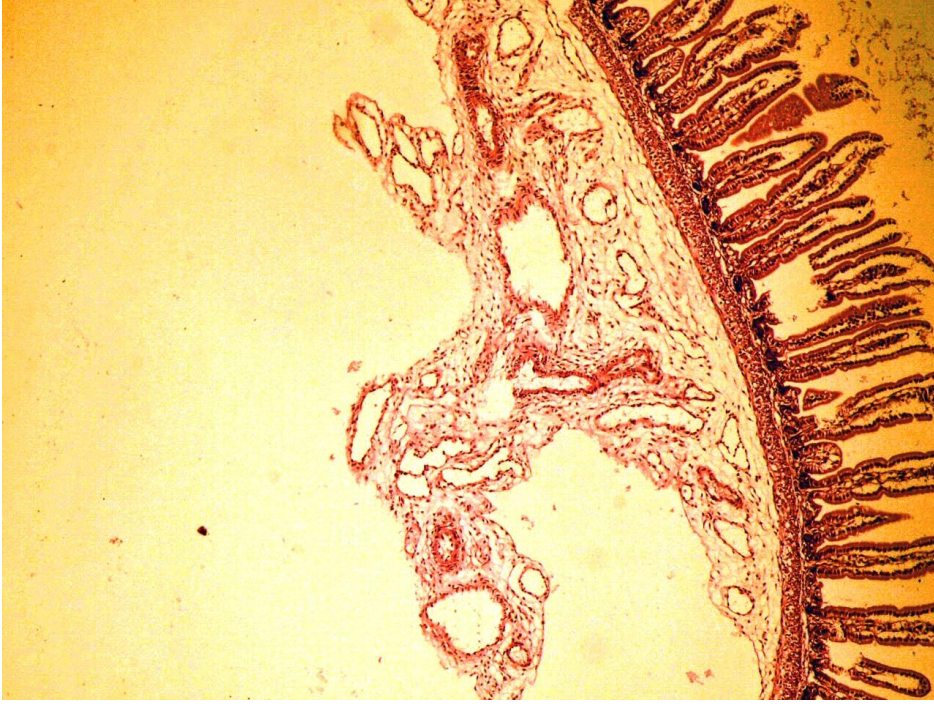
Tablo 10: Grupların histopatolojik karşılaştırma skorlaması: 0: yok 1: var.

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	P Grup 1-2	P Grup 1-3	P Grup 2-3
Atrofi	8/0	0/8	8/0	,0001	1.20	,0001
Ödem	8/0	0/8	8/0	,0001	,0001	,0001
Vaskülarizasyon	0/8	7/1	2/6	,0001	,0001	,001
İskemi	8/0	4/4	5/3	,0001	,0001	0,201
İnfilamasyon	8/0	6/2	7/1	,0001	,0001	0,5

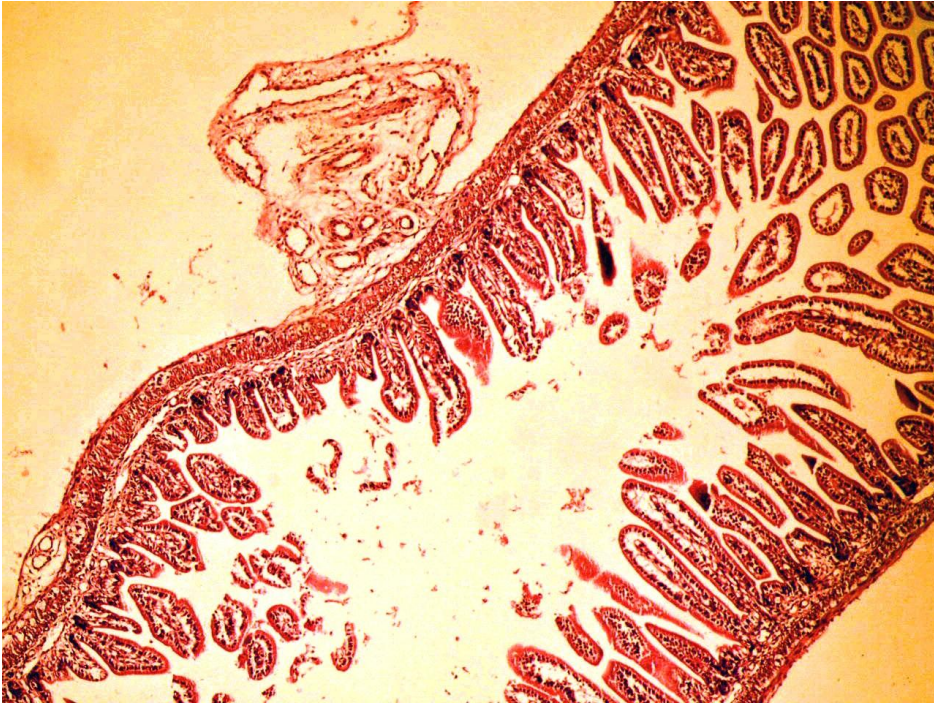
Tablo 11: Grupların histopatolojik özelliklerinin karşılaştırılması



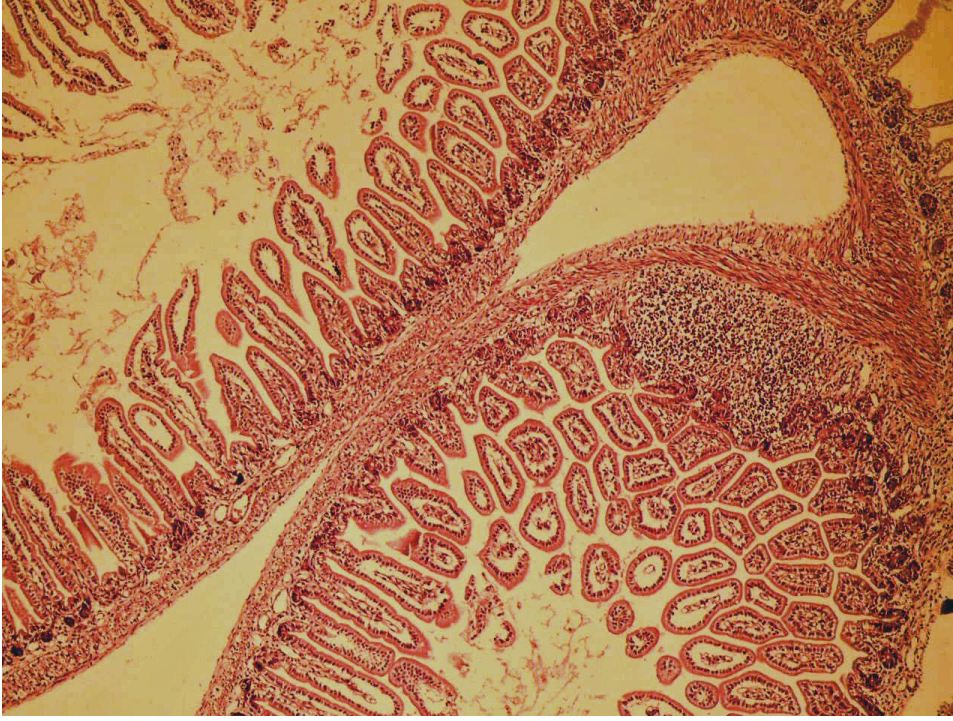
Şekil 6: Grupların histopatolojik inceleme sonuçları



Resim 5. Grup 1’de X 100 büyütmede normal boyda villüs yapısı görülmektedir.



Resim 6. Grup 2’de X100 büyütmede belirgin atrofi ve kısalma olan villus yapısı görülmektedir.



Resim 7: Gen tedavisi yapılan grupta X100 büyütmede boyu uzamış ve normal yapı ile aynı görüntüde villus yapısı görülmektedir.

5. TARTIŞMA

Nekrotizan enterokolit sıklıkla prematüre yenidoğanları etkileyen önemli bir bağırsak hastalığıdır (1). Son yıllarda, YYBÜ'deki bilimsel ve teknolojik gelişmelere rağmen, NEK'de mortalite oranlarının düzelmediği, bu oranın %10 ile %50 arasında olduğu rapor edilmiştir (1,2,3). NEK insidansı %1-5 arasında değişmekte ve olguların %65-95'ini prematürelere oluşturmaktadır (3). Bununla doğru orantılı olarak NEK'e bağlı ölüm ve uzun dönem komplikasyonlarda da artış görülmektedir. NEK'teki yüksek mortalite oranı, uzun dönemde ciddi komplikasyonların oluşması ve hastane masraflarının fazla olması patofizyolojiye ve hastalığın tedavisine yönelik çalışmalara ne kadar fazla ihtiyaç olduğunu açıklamaktadır.

Etyopatogenezinde sorumlu tutulabilecek birçok risk faktörü bulunmasına rağmen kesin sebep henüz ortaya konabilmiş değildir. Son dönemde oluşturulan deneysel hayvan modelleri, genellikle etyolojide en fazla suçlanan faktörler olan, prematürite, hipoksi, formül mama ile beslenme, intestinal iskemi-reperfüzyon hasarı ve enfeksiyon temeline dayandırılmaktadır (1-5). Bu modellerde oluşturulan barsak hasarlarında histopatolojik ve biyokimyasal olarak NEK benzeri değişiklikler ortaya konmuştur. Hipoksinin NEK oluşumuna olan etkisi azalmış mukozal kan akımı ve artmış oksijen ihtiyacı üzerinden olmaktadır. Ayrıca hipoksik stres PAF miktarını artırmakta ve serbest oksijen radikal hasarı yapmaktadır. Hipoksinin GİS motilitesi üzerine de olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir. Hayvanlarda hipoksi oluşturularak yapılan bazı deneysel çalışmalarda hipoksinin intestinal intirinsik ritmi ve mide boşalmasını geciktirdiği, spontan ince barsak ve mide kontraksiyonlarını azalttığı gösterilmiştir. Hipoksinin neden olduğu GİS kontraksiyon azalması indirekt olarak da bakteri translokasyonu riskini artırmaktadır. Bu motilite azalması hayvan deneylerinin yanı sıra izole insan barsağında da gösterilmiştir. Barlow ve ark. (148) yaptıkları deneysel çalışmada, kapalı ortamda hipoksi ve soğuk strese maruz bırakılan yenidoğan ratlarda histopatolojik olarak NEK benzeri intestinal hasar oluşturmuşlardır. Mevcut hasarın hipoksi ve soğuk stresin süresiyle doğru orantılı olarak arttığını ve hipoksiyle birlikte oral formül mama ile beslenmenin hasarı daha da arttırdığını ortaya koymuşlardır. Nadler ve ark. (149) kendileri tarafından tanımlanan hiperosmolar formül mama ile beslenen yenidoğan ratların ince barsaklarında, biyokimyasal ve histopatolojik kriterlerle ortaya konan NEK benzeri bulgular tespit

etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da NEK oluşturmak için hipoksiye ilave olarak soğuk stres ve formül mama ile beslenme uygulanmış sonucunda histopatolojik olarak NEK benzeri bulgular görülmüştür.

Literatürde tedavi ile ilgili çalışmalar genelde hipoksinin ya da inflamasyonun önlendiği yeniden kanlanmanın sağlandığı çalışmalardır. Bu çalışmalarda genelde hipoksiyi önleyen maddeler ya da yeni damar oluşumuna yol açan faktörler çalışılmıştır. Yurdakok ve arkadaşlarının (150) yaptığı çalışmada hipoksi ile NEK modeli oluşturulmuş, tedavide insulin kullanılmış ve sonuçta hipoksik hasarın geri dönmediği tespit edilmiştir. İnflamasyonu önlemeye yönelik çalışmalarda ise bir çok ajan denenmiştir. Baregamian ve ark yaptığı çalışmada PPAR gamma agonistlerinin antiinflamatuvar etkilerinden faydalanılmış ve tedavinin etkili olduğu vurgulanmıştır (151). Eckmann ve ark yaptığı çalışmada ise NF kappa B nin anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik etkileri incelenmiş sonuçta doku düzeyinde olumlu etkileri saptanmıştır (152).

Çalışmamızda denenen VEGF bir büyüme faktörüdür. NEK tedavisinde etkinliği bilinmemekle beraber yeni damar oluşumunu artırması ve kolay uygulanabilir olması dolayısıyla çalışmamızda kullanılmıştır. Özellikle son yıllarda büyümeyi artıran büyüme faktörlerin NEK tedavisinde kullanılması ile ilgili bir çok çalışma yürütülmüştür. Bu faktörlerin ya parenteral olarak ya da enteral olarak kullanımının NEK oluşturulan yavru ratlarda yararlı etkileri kanıtlanmıştır (153). Büyüme faktörleri ile yapılan en önemli çalışmalardan biri Maynard ve ark yaptığı çalışmadır (153). Bu çalışmada EGF'nin NEK enterokolit modelinden koruyucu etkisi olduğu ve bu etkileri barsakta otofajiyi engelleyerek yaptığını göstermişlerdir. Sullivan ve ark.'ları rekombinan EGF kullanarak yaptıkları çalışmada tedavi alan grupta kript aktivitesinin daha sık geliştiğini göstermişlerdir (154). Yapılan çalışmalarda NEK gelişen prematürelere serum ve tükrüklerinde EGF düzeylerinin aynı gebelik haftasında NEK olmayan prematürelere göre daha düşük olduğu saptanmıştır (155,156). EGF ailesinin bir diğer üyesi olan heparin-bağlayıcı epidermal-benzeri büyüme faktörü (HB-EGF) ile yapılan deneysel çalışmada NEK'li farelere HB-EGF verildiğinde mukozal bütünlük ve epitelyal bariyerin sağlanmasında olumlu sonuçlar elde edilmiştir (157).EPO ve EPO benzeri büyüme faktörlerinin de mukozal hasarı engellemede etkili olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (158). Hem fetal dönemde hem de erişkinde endotel hücrelerin yaptığı birçok

fonksiyonda, vaskülogenez ve anjiogenezde önemli ve gerekli bir büyüme faktörü olan VEGF vücutta birçok farklı hücrede sentezlenir (123,124,129). VEGF salgılanmasını EGF de dahil olmak üzere birçok büyüme faktörünün başlatması bu faktörlerin mitojeniteyi VEGF salgılatarak arttırdıklarını göstermiştir (123,129). Çalışmamızda NEK modelinde büyüme faktörlerinden VEGF tedavisini kullandık. Literatürde NEK'te VEGF tedavisi ilk defa denenmiştir.

Bu tedavinin etkinliğini artırmak amacıyla VEGF geni plazmide klonlanarak verildi. Plazmide klonlama (gen tedavisi) günümüzde üzerinde oldukça sık araştırma yapılan bir konudur. Plazmide klonlanan maddeler ile saf maddeler arasında yapılan çalışmalarda klonlamanın etkisinin hücresel düzeyde saf maddenin üretimini artırdığı için daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Normalde dışarıdan verilen maddenin etkisini gösterebilmesi için hücre yüzeyinde spesifik reseptörlere bağlanıp DNA sentezini arttırması gerekir fakat plazmide bağlı olarak verilen madde son ürün olduğu için etkisi daha kuvvetli olmaktadır. Yara iyileşmesinde gen terapisi kullanmanın ana hedefi hızlı iyileşmenin sağlanması, doku fonksiyonlarının yerine getirilmesi ve aşırı skar dokusu oluşmasının engellenmesidir (131). Viral vektörlere bağlanmış büyüme faktör genleri çok sık çalışılan konulardır. Liechly ve ark. trombosit kaynaklı büyüme faktörü B (PDGF-B) genini adenoviral vektör ile iskemik tavşan kulağı modelindeki kronik yaralara transfer etmişlerdir. İskemik yaraların tek uygulamada tedavi edildiğini ve epitelizasyonun iskemik olmayan kontrol grubuna göre daha hızlı olduğunu görmüşlerdir. Fakat adenovirüs kapsid proteinlerine bağlı akut inflamatuvar yanıt gelişmiştir (132,133). Dodato ve Galeano iki ayrı çalışmada VEGF A geninin adeno ilişkili virüs ile transferi için bir model geliştirmiştir. Çalışmalarında cerrahiden 6-10 gün sonra yara iyileşmesinin belirgin olarak hızlandığını, 18 gün sonra iyi yapılanmış granülasyon dokusunun geliştiğini ve vaskülarizasyonun arttığını bildirmişlerdir (133). Viral vektörler akut inflamatuvar yanıt oluşturabilirler. Birçok alıcının dolaşımında viral vektör uygulaması sonrası antikor oluşumu ve T hücre yanıtı gözlenmiştir. Akut inflamatuvar yanıt hayatı tehdit edebilecek bir duruma kadar ilerleyebilmektedir. İmmünojenik hale gelen hücrelerin yıkılması sonucunda üretilen protein miktarında ani azalma gözlenmektedir. İmmün yanıtla bağlı transdüksiyon engellenebilir ya da enfekte hücreler elimine edilebilir.

Bu da vektörün tekrarlayan uygulamalarda kullanımını engeller. Aynı zamanda viral vektörlerin üretilmesi pahalı ve zaman alıcı bir yöntemdir (134).

Viral olmayan yöntemler değişik araçlarla DNA'nın hücrelere veya dokulara sunulması ile gerçekleştirilir. DNA'nın direkt enjeksiyonu tanımlandıktan sonra Erickson ve arkadaşları geliştirilmiş solid enjektörlerle DNA enjeksiyonu yöntemine 'microseeding' ismini vermişlerdir (131). Enjeksiyon ile gen transferi sonrasında genin kodladığı proteinlerin üretilmeleri geçicidir ve ilk 3 gün en yüksek düzeyde görülür. Çalışmamızda kolay üretilmesi ve kolay olması yanında uzun süreli gen ekspresyonuna ihtiyacımız olmadığı için plazmid aracılığıyla gen transferini tercih ettik. Lokal plazmid infiltrasyonunun kullanmamızın diğer bir avantajı da verilen büyüme faktör genlerinin lokal etki gösterip sistemik etkilerinin olmamasıdır. Lord ve ark. özofagus ve mide adeno kanserlerinde FGF ve VEGF düzeylerinin artmakta olduğunu bildirmiş ve büyüme faktörlerinin gastrointestinal kanserli vakalarda kullanımının hematolojik ve lenfatik metastazları artırabileceğini düşünmektedirler. Lokal kısa süreli ekspresyonu olan büyüme faktörleri ile bu sorunun çözülebileceğini düşünmekteyiz (153).

Gen uygulamalarında aracıya bağlanan genin dokudaki katmanları aşip doğru hücrelere ulaşması önemli bir problemdir. Ayrıca verilen yabancı materyalin hücre içine alınmaması, lizisi ve ya aktif olarak transkripsiyonunun yapılamaması da sık görülür. Transfer yönteminin etkinliği dokuda üretilen gen ürünlerinin ölçülmesiyle tespit edilebilir. Çalışmamızda doku büyüme faktör düzeylerini incelediğimizde, kullandığımız plazmid aracılı viral olmayan gen transfer metodunun başarılı olabileceğini düşünmekteyiz. VEGF geni verildikten 4 gün sonra dokuda bakılan VEGF düzeyleri yaklaşık 2 kat artmaktadır. Enestvedt ve ark. çalışmalarında VEGF165 genini plazmide bağlayıp lokal enjeksiyon şeklinde kullanmışlardır. Çalışmalarında doku VEGF düzeyleri artmış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (159). Karpisaola ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise anjiogenik gen tedavisi sonrası kapiller proliferasyonun ve doku vaskülarizasyonunun arttığı fakat yan etki olarak hücrelerin immortal olduğu görülmüştür (160,161). Yine diğer bir çalışmada VEGF A ve VEGF B genlerinin intramüsküler olarak uygulanmasının parakrin etkiler ile anjiogenezi artırdığı ve bu etkilerin oldukça kuvvetli olduğunu tespit etmişlerdir. Bizim çalışmada da gen tedavisi literatürle uyumlu olarak dokuda VEGF reseptörlerinin düzeyini ve

histopatolojik vaskülarizasyonu artırmıştır. Ayrıca yapılan immünohistokimyasal analizde VEGF tedavi grubunda kontrol grubu ve sham grubuna göre VEGF düzeyi anlamlı olarak yüksek bulunmuş ayrıca vaskülarizasyonun da anlamlı olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda karşılaştığımız diğer önemli bir bulgu ise, NEK oluşturulan yavru ratlarda intestinal villüslerin boylarında kısalma ve küntleşme olduğudur. VEGF tedavisinin villüs boylarını artırdığı ve normale getirdiği tespit edilmiştir. VEGF bir tür büyüme faktörüdür ve villüsler üzerine trofik etkisi bizim çalışmamızda kanıtlanmıştır. Ayrıca bu etkinin gen tedavisinin yan etkisi olarak literatürde belirtilen hücrelerin immortal özellik kazanması ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Gen tedavisi ile ilgili diğer bir sorun bu tedavinin dokuda inflamatuvar yanıtı artırmasıdır. İnflamatuvar yanıt artışı yara iyileşmesini geciktirmektedir. Özellikle virüslerle gen transferinden sonra inflamatuvar yanıt artışı görülebilmektedir. Çalışmamızda kullandığımız plazmid ve plazmide bağlı genlerin literature ters olarak inflamasyonu arttırmadığı tespit edilmiştir.

NEK'te dokuda oksidatif hasarın ve apoptozisin arttığı tespit edilmiştir. Gaul ve ark yaptığı çalışmada NEK sonrası dokuda oksidatif hasarın arttığı ve probiyotiklerin bu hasarı azalttığı tespit etmiştir (162). Shah ve ark'nın yaptığı çalışmada ise NEK'te arginin tedavisinin oksidatif hasarı geri çevirdiği ve doku üzerine olumlu etkileri olduğu tespit edilmiştir (163). Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak doku oksidatif hasar düzeyleri NEK oluşturulan ratlarda artmıştır. Ayrıca apoptozis düzeyleri incelendiğinde bu düzeylerin NEK'li ratlarda daha fazla olduğu tespit edilmiştir. VEGF gen tedavisinin ise oksidatif hasar parametrelerini ve apoptozisi iyileştirdiği tespit edilmiştir. Çalışmamızın en önemli dezavantajlarından biri apoptozis düzeyinin immünohistokimyasal olarak çalışılmamasıdır. Literatürde apoptozis düzeyinin immünohistokimyasal olarak TUNEL metodu ile çalışılmasının bizim kullandığımız ELİSA yöntemine göre daha üstün olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, NEK etyolojisi net olarak aydınlatılamayan fakat halen YYBÜ'de önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. Etiyolojisi net olarak aydınlatılamadığı için tedavisinde halen deneysel anlamda bir çok madde denenmektedir fakat bu gün için klinik pratiğe girmiş bir madde bulunamamıştır. Büyüme faktörleri üzerinde sık araştırmalar yapılan ve deneysel anlamda etkileri kanıtlanmış önemli ajanlardır.

Çalışmamızda vaskülarizasyonu artıran önemli bir büyüme faktörü olan VEGF denenmiş ve bu faktörün etkinliğini artırabilmek için plazmide klonlanarak gen tedavisi şeklinde verilmiştir. Gen tedavisi sonucunda dokuda vaskülarizasyonun arttığı, oksidatif hasarın ve inflamasyonun azaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar VEGF geni tedavisinin NEK'te etkin olduğunu göstermekte olup bu etkinliğin kliniğe yansımaları anlamak için geniş serili çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR

NEK günümüzde YYBÜ’de oldukça sık görülen bir hastalıktır. Etyolojisi tam aydınlatılamadığı için kesin bir tedavisi yoktur. Fakat gelişen komplikasyonları önlemede bir çok tedavi denenmektedir.

Gen tedavisi dokuya direk etkili genin verilmesi ile yapılan ve literatürde son zamanlarda oldukça fazla araştırmalar yapılan güncel bir tedavidir. Bizim çalışmamızda iskemi ile oluşturulan NEK modelinde , plazmide klonlanmış VEGF geninin etkileri biokimyasal ve histopatolojik veriler ışığında araştırılmıştır. Sonuçta iskeminin oluşturduğu NEK modelinde vaskülarizasyonun azaldığı, villüslerde atrofi olduğu tespit edilmiş, gen tedavisi ile vaskülarizasyonun arttığı ve villüs atrofisinin gerilediği tespit edilmiştir. VEGF geni tedavisinin NEK’te iskeminin erken fazında kullanılması vaskülarizasyonu ve iskemi etkilerini geri çevirebilir. Bu konu ile ilgili geniş vakalı klinik ve deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

- 1.** Lin PW, Stoll BJ. Necrotising enterocolitis. *Lancet* 2006; 368:1271-1283.
- 2.** Barbara Noerr, RNC, MSN, CRNP. Part 1. Current Controversies in the Understanding of necrotizing enterocolitis. *Advances in Neonatal Care*, Vol 3, No 3 (june), 2003: pp 107–120.
- 3.** Can Başaklar. Yenidoğanlarda gastrointestinal Kanama. *Bebek ve Çocukların Cerrahi ve Ürolojik Hastalıkları*. Ankara Palme Yayıncılık, 2006. Bölüm 35. 757–783.
- 4.** Hsueh W, Caplan MS, Qu XW, Tan XD, De Plaen IG, Gonzales-Crussi F. Neonatal necrotizing enterocolitis: clinical considerations and pathogenic concepts. *Pediatr Dev Pathol* 2003;6:6-23.
- 5.** Albanese CT, Rowe MI. Necrotizing enterocolitis. In: O'Neill Jr. JA, Rowe MI, Grosfeld JL, Fonkalsrud EW, Coran AG (Eds.). *Pediatric surgery*. 5th ed. St. Louis: Mosby; 1998. p.1297- 320.
- 6.** Wilson R, Kanto W.P Jr, McCarthy B.J., Burton T, Lewin P, Terry J, Feldman R.A. Epidemiologic characteristics of necrotizing enterocolitis: a population-based study. *Am J Epidemiol* 1981;114:880–7.
- 7.** Llanos AR, Moss M E, Pinzon M C, Dye T, Sinkin RA, Kendig JW. Epidemiology of neonatal necrotizing enterocolitis: a population-based study. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2002; 16: 342-49.
- 8.** Vanderhoof J.A., Zach T.L., Adrian T.E. Gastrointestinal disease. In: Avery G.B., Fletcher M.A. MacDonald M.G (eds). *Neonatology: Pathophysiology and Management of the Newborn*. 5nd edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 1999. p.739–63
- 9.** Hartman G.E., Boyajian M.J., Choi S.S et al. General surgery. In: Avery G.B., Fletcher M.A., MacDonald M.G (eds). *Neonatology: Pathophysiology and Management of the Newborn*. 5nd edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 1999. p.1005-44.
- 10.** Lee JS, Polin RA. Treatment and prevention of necrotizing enterocolitis. *Semin Neonatol* 2003; 8: 449-459.
- 11.** Walsh MC, Kliegman RM. Necrotizing enterocolitis: treatment based on staging criteria. *Pediatr Clin North Am* 1986;33:179-201.

- 12.** Ostlie DJ, Spilde TL, St Peter SD, Sexton N, Miller KA, Sharp RJ. Necrotizing enterocolitis in full-term infants. *J Pediatr Surg* 2003;38:1039-42.
- 13.** Kosloske AM. Epidemiology of necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr Suppl* 1994;396:2-7.
- 14.** Nicola J. Brown, Phda; Edward A. E. Smyth. Angiogenesis induction and regression in human surgical wounds. *Wound Rep Reg* 2002; 10: 245–251.
- 15.** Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol* 1998;152:1445–1452.
- 16.** Senger DR, Ledbetter SR, Claffey KP, Papadopoulos-Sergiou A, Peruzzi CA, Detmar M. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability actor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the alphavbeta3 integrin, osteopontin, and thrombin. *Am J Pathol* 1996; 149: 293–305.
- 17.** Rissanen TT, Rutanen J, Ylä-Herttua S.: Gene transfer for therapeutic vascular growth in myocardial and peripheral ischemia. *Adv Genet.* 2004;52:117-164.
- 18.** Siddhesh D. Patil,1 David G. Rhodes. DNA-based Therapeutics and DNA Delivery Systems: A Comprehensive Review. *The AAPS Journal* 2005; 7 :61-76.
- 19.** Stoll BJ, Kanto WP Jr, Glass RI, Nahmias AJ, Brann AW Jr. Epidemiology of necrotizing enterocolitis: a case control stuy. *J Pediatr* 1980; 96:447-51.
- 20.** Aslan Y, Ayvaz A, Yıldırım A, ve ark. Nekrotizan enterokolit: 62 olgunun değerlendirilmesi. *Pediatric Cerrahi Dergisi* 2001; 15: 20-27.
- 21.** Sankaran K, Puckett B, Lee DS, Seshia M, Boulton J, Qiu Z, et al. Variations in incidence of necrotizing enterocolitis in Canadian neonatal intensive care units. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;39:366-72.
- 22.** Maayan-Metzger A, Itzhak A, Mazkereth R, Kuint J. Necrotizing enterocolitis in full-term infants: case-control study and review of the literature. *J Perinatol* 2004;24:494-99.
- 23.** McElhinney DB, Hedrick HL, Bush DM, Pereira GR, Stafford PW, Gaynor JW. Necrotizing enterocolitis in neonates with congenital heart disease: risk factors and outcomes. *Pediatrics* 2000;106:1080-87.

- 24.** Holman RC, Stoll BJ, Clarke MJ, Glass RI. The epidemiology of necrotizing enterocolitis infant mortality in the United States. *Am J Public Health* 1997;87:2026-31.
- 25.** Pickler R.H., Terrell B.V. Nonnutritive sucking and necrotizing enterocolitis. *Neonatal Netw* 1994;13:15–8.
- 26.** Uauy R.D., Fanaroff A.A., Korones S.B., Phillips E.A., Phillips J.B., Wright L.L. Necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants:biodemographic and clinical correlates. National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *J Pediatr* 1991; 119:630–8.
- 27.** Kaul A, Balistreri W.F. Necrotising enterocolitis. In: Fanaroff A.A., Martin R.J (eds). *Neonatal-Perinatal Medicine: Diseases of the Fetus and Infant*. 7nd edition. St. Louis: Mosby 2002.p.1297–1307.
- 28.** Luig M, Lui K. Epidemiology of necrotizing enterocolitis-Part II: Risks and susceptibility of premature infants during the surfactant era: a regional study. *J Paediatr Child Health* 2005; 41: 174-79.
- 29.** Henry CM, Moss RL. Current issues in the management of necrotizing enterocolitis. *Semin Perinat* 2004;28:221-33.
- 30.** Petty JK, Ziegler MM. Operative strategies for necrotizing enterocolitis: The prevention and treatment of short-bowel syndrome. *Semin Pediatr Surg* 2005; 14: 191-198
- 31.** Vohr BR, Wright LL, Dusick AM, et al. Neurodevelopmental and functional outcomes of extremely low birth weight infants in the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network, 1993-1994. *Pediatrics* 2000;105:1216-26.
- 32.** Gerber AR, Hopkins RS, Lauer BA, Curry-Kane AG, Rotbart HA. Increased risk of illness among nursery staff caring for neonates with nerotizing enterocolitis. *Pediatr Infect Dis* 1985; 4: 246-49.
- 33.** Treszl A, Tulussay T, Vasarhelyi B. Genetic basis for necrotizing enterocolitis –risk factors and their relations to gentic polymorphisms. *Front Biosci* 2006;11:570-580.
- 34.** Martin CR, Walker WA. Intestinal immune defences and the inflammatory response in necrotizing enterocolitis. *Semin Fetal Neonatal Med* 2006;11:369-377.

35. Crissinger KD. Understanding necrotizing enterocolitis-promising directions. *Pathophysiology* 1999;5:247-56.
36. Ewer AK. Role of platelet-activating factor in the pathophysiology of necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr Suppl* 2002;91:2-5.
37. Caplan M. Neonatal necrotizing enterocolitis. In: Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh (eds). *Fanaroff and Martin's Neonatal-Perinatal Medicine Diseases of the Fetus and Infant*. Philadelphia, Mosby Elsevier, 2006:1403-1417.
38. Ryder RW, Shelton JD, Guinan ME. Necrotizing enterocolitis: a prospective multicenter investigation. *Am J Epidemiol*. 1980;112:113-123.
39. Sase M, Miwa I, Sumie M, et al. Gastric emptying cycles in the human fetus. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193: 1000-1004.
40. Neu J, Chen M, Beierle E. Intestinal innate immunity: how does it relate to the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 2005; 14:137-144.
41. Hyman PE, Clarke DD, Everett SL, Sonne B, Stewart D, Harada T, Walsh JH Taylor IL. Gastric acid secretory function in preterm infants. *J Pediatr*. 1985 Mar;106(3):467-71.
42. Lebenthal A, Lebenthal E. The ontogeny of the small intestinal epithelium. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1999;23:S3-S6.
43. Otte JM, Kiehne K, Herzig KH. Antimicrobial peptides in innate immunity of the human intestine. *J Gastroenterol* 2003; 38: 717-726.
44. Playford RJ, Hanby AM, Gschmeissner S, Peiffer LP, Wright NA, McGarrity T. The epidermal growth factor reseptor (EGF-R) is present on the basolateral, but not the apical, surface of enterocytes in the human gastrointestinal tract. *Gut* 1996; 39: 262-266.
45. 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: 524-528.
46. Helmtrath MA, Shin CE, Fox JW, Erwin CR, Warner BW. Epidermal growth factor in saliva and serum of infants with necrotizing enterocolitis. *Lancet* 1998; 351:266-267.
47. Wong WM, Wright NA. Epidermal growth factor, epidermal growth factor receptors, intestinal growth and adaptation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1999; 23: S83-S88.

48. Neu J. Neonatal necrotizing enterocolitis: an update. *Acta Paediatr Suppl* 2005;94:100-105.
49. Potoka DA, Nadler EP, Upperman JS, Ford HR. Role of nitric oxide and peroxynitrite in gut barrier failure. *World J Surg* 2002;26:806-11.
50. Schnabl KL, Aerde J, Thomson BR, Clandinin MT. Necrotizing enterocolitis: A multifactorial disease with no cure. *World J Gastroenterol* 2008;14(14): 2142-2161.
51. Donovan SM. Role of human milk components in gastrointestinal development: Current knowledge and future needs. *J Pediatr* 2006; 149 Suppl 1: S49-S61.
52. Caplan MS, Simon D, Jilling T. The role of PAF, TLR, and the inflammatory response in neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 2005;14:145-51.
53. Chen Z, Hagler J, Palombella VJ, et al. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 1995; 9:1586-1597.
54. Jilling T, Lu J, Jackson M, Caplan MS. Intestinal epithelial apoptosis initiates gross bowel necrosis in an experimental rat model of neonatal necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res* 2004;55:622-9.
55. Gosche JR, Harris PD, Garrison RN. Age-related differences in intestinal microvascular responses to low-flow states in adult and suckling rats. *Am J Physiol* 1993; 264: G447-453.
56. Chun K, Drugas G, Ferguson D, Biewer J, Clemens MG. Intestinal villus microcirculatory response to hemorrhage in adult and immature rats. *J Pediatr Surg* 1992; 27:322-328.
57. Reber KM, Nankervis CA, Nowicki PT. Newborn intestinal circulation. *Physiology and pathophysiology. Clin Perinatol* 2002; 29: 23-39.
58. Akisu M, Ozmen D, Baka M, et al. Protective effect of dietary supplementation with L-arginine and L-carnitine on hypoxia/reoxygenation-induced necrotizing enterocolitis in young mice. *Biol Neonate* 2002; 81: 260-265.
59. Chandler JC, Hebra A. Necrotizing enterocolitis in infants with very low birth weight. *Semin Pediatr Surg* 2000;9:63-72.

- 60.** Powis MR, Smith K, Rennie M, Halliday D, Pierro A. Characteristics of protein and energy metabolism in neonates with necrotizing enterocolitis--a pilot study. *J Pediatr Surg* 1999;34:5-10.
- 61.** Anderson DM, Kliegman RM. The relationship of neonatal alimentation practices to the occurrence of endemic necrotizing enterocolitis. *Am J Perinatol* 1991;8:62-7.
- 62.** Berseth CL, Poenaru D. Necrotizing enterocolitis and short bowel syndrome. In: Taeusch HW, Ballard RA, Gleason CA (Eds.). *Avery's diseases of the newborn*. 8 th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p.1123-33.
- 63.** La Gamma EF, Browne LE. Feeding practices for infants weighing less than 1500 G at birth and the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol* 1994;21:271-306.
- 64.** MacKendrick W, Hill N, Hsueh W, Caplan M. Increase in plasma platelet-activating factor levels in enterally fed preterm infants. *Biol Neonate* 1993; 64: 89-95.
- 65.** Amer MD, Hedlund E, Rochester J, Caplan MS. Platelet-activating factor concentration in the stool of human newborn: effect of enteral feeding and neonatal necrotizing enterocolitis. *Biol Neonate* 2004; 85: 159-166.
- 66.** Neu J. Necrotizing enterocolitis: the search for a unifying pathogenic theory leading to prevention. *Pediatr Clin North Am* 1996;43:409-32.
- 67.** Coit AK. Necrotizing enterocolitis. *J Perinat Neonatal Nurs* 1999;12:53-66.
- 68.** Okur H, Küçükaydın M, Köse K, Konta O, Doğan P, Kazez A. Hipoxia-induced necrotizing enterocolitis in the immature rat: the role of lipid peroxidation and management by vitamin E. *J Pediatr Surg* 1995; 30: 1416-1419.
- 69.** Miller MJS, McNeill H, Mullane KM. SOD prevents damage and attenuates eicosanoid release in rabbit model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol* 1988;
- 70.** Cueva JP, Hsueh W. Role of oxygen derived free radicals in platelet activating factor induced bowel necrosis. *Gut* 1988; 29: 1207-1212.
- 71.** Lawrence G, Bates J, Gaul A. Pathogenesis of neonatal necrotizing enterocolitis. *Lancet* 1982;1:137-9.
- 72.** 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;116:960-964.

- 73.** Parks DA, Bulkley GB, Granger DN. Role of oxygen-derived free radicals in digestive tract diseases. *Surgery* 1983;94:415-22.
- 74.** Harris MC, Costarino AT, Sullivan JS, Dulkerian S, McCawley L, Corcoran L et al. Cytokine elevations in critically ill infants with sepsis and necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1994;124:105-11.
- 75.** Caplan MS, Miller-Catchpole R, Kaup S: Bifidobacterial supplementantation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Gastroenterology*. 1999;116:960-964.
- 76.** Akisü M, Baka M, Yalaz M, Hüseyinov A, Kültürsay N. Supplementation with *Saccharomyces boulardii* ameliorates hypoxia/reoxygenation-induced necrotizing enterocolitis in young mice. *Eur J Pediatr Surg*. 2003;13:319-323.
- 77.** Lin J. Too much short chain fatty acids cause neonatal necrotizing enterocolitis. *Medical Hypotheses*. 2004;62:291-293.
- 78.** Nafday SM, Chen W, Peng L, Babyatsky MW, Holzman IR, Lin J. Shortchain fatty acids induce colonic mucosal injury in rats with various postnatal ages. *Pediatr Res*. 2005;57:201-204.
- 79.** Finer NN, Peters KL, Hayek Z, Merkel CL. Vitamin E and necrotizing enterocolitis. *Pediatrics*. 1984 Mar;73(3):387-93.
- 80.** Alpan G, Eyal F, Vinograd I, Udassin R, Amir G, Mogle P, Glick B. Localized intestinal perforations after enteral administration of indomethacin in premature infants. *J Pediatr*. 1985 Feb;106(2):277-81.
- 81.** Nowicki PT, Oh W. Methylxanthines and necrotizing enterocolitis revisited. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1989 Aug;9(2):1378
- 82.** Treszl A, Kocsis I, Szathmari M, Schuler A, Tulussay T, Vasarhelyi B. Genetic variants of tumor necrosis factor-alpha promoter gene do not influence the development of necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr* 2001; 90:1182-1185.
- 83.** Yost CC. Neonatal necrotizing enterocolitis: diagnosis, management and pathogenesis. *I Infus Nurs* 2005; 28:130-134.
- 84.** Kanto WP, Hunter JE, Stoll BJ. Recognition and medical management of necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol* 1994;21:335-46.

- 85.** Akisu M. Nekrotizan enterokolitten korunma stratejileri. Anne ve Bebek Sağlığı Vakfı II. Neonatoloji gŒnleri program ve Œzet kitabı s.59-60, İstanbul, 2005.
- 86.** Akisu M, Kultursay N, Ozkayin N, Coker I, Huseyinov A. Platelet-activating factor levels in term and preterm human milk. *Biol Neonate* 1998;74:289-93.
- 87.** Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 2001; 11: 372-377.
- 88.** Birk D, Berger D, Limmer J, Beger HG. Is the elimination of endotoxin and cytokines with continuous lavage an alternative procedure in necrotizing enterocolitis? *Acta Paediatr Suppl* 1994;396:24-6.
- 89.** Kishimoto T, Hibi M, Murakami M, Narazaki M, Saito M, Taga T. The molecular biology of interleukin 6 and its receptor. *Ciba Found Symp* 1992; 167:5-16; discussion 16-23.
- 90.** Tilg H, Dinarello CA, Mier JW. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunol Today* 1997; 18: 428-432.
- 91.** Morecroft JA, Spitz L, Hamilton PA, Holmes SJ. Plasma cytokine levels in necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr Suppl* 1994;396:18-20.
- 92.** Kang BY, Kim E, Kim TS. Regulatory mechanisms and their therapeutic implications of interleukin-12 production in immune cells. *Cell Signal* 2005;17:665-673.
- 93.** Muhl H, Pfeilschifter J. Interleukin-18 bioactivity: a novel target for immunopharmacological anti-inflammatory intervention. *Eur J Pharmacol* 2004; 500: 63-71.
- 94.** Mukaida N. Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *Int J Hematol* 2000; 72: 391-398.
- 95.** Edelson MB, Bagwell CE, Rozycki HJ. Circulating pro- and counterinflammatory cytokine levels and severity in necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* 1999;103:766-71.
- 96.** Gonzalez-Crussi F, Hsueh W. Experimental model of ischemic bowel necrosis. The role of platelet-activating factor and endotoxin. *Am J Pathol* 1983;112:127-35.
- 97.** Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000; 117: 1162-1172.
- 98.** Le T, Leung L, Carroll WL, Schibler KR. Regulation of interleukin-10 gene expression: possible mechanisms accounting for its upregulation and for maturational differences in its expression by blood mononuclear cells. *Blood* 1997; 89: 4112-4119.

- 99.** Jones CA, Cayabyab RG, Kwong KY, Stotts C, Wong B, Hamdan H et al. Undetectable interleukin (IL)-10 and persistent IL-8 expression early in hyaline membrane disease: a possible developmental basis for the predisposition to chronic lung inflammation in preterm newborns. *Pediatr Res* 1996;39:966-75.
- 100.** Du X, Liu Q, Yang Z, Orazi A, Rescorla FJ, Grosfeld JL et al. Protective effects of interleukin-11 in a murine model of ischemic bowel necrosis. *Am J Physiol* 1997;272:545-52.
- 101.** Duh G, Mouri N, Warburton D, Thomas DW. EGF regulates early embryonic mouse gut development in chemically defined organ culture. *Pediatr Res* 2000;48:794-802.
- 102.** Miettinen PJ. Epidermal growth factor receptor in mice and men- any applications to clinical practice? *Ann Med* 1997; 29: 531-534.
- 103.** MacKendrick W, Caplan M, Hsueh W. Endogenous nitric oxide protects against platelet-activating factor-induced bowel injury in the rat. *Pediatr Res* 1993;34:222-8.
- 104.** Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329(27):2002-12.
- 105.** Grover Z, Tubman R, McGuire W. Glutamine supplementation for young infants with severe gastrointestinal disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(1):5947-53.
- 106.** Becker RM, Wu G, Galanko JA, Chen W, Maynor AR, Bose CL et al. Reduced serum amino acid concentrations in infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 2000;137:785-93.
- 107.** Acunas B, Vatansever U, Duran R, Aladag N. Çok düşük tartılı yenidoğanlarda nekrotizan enterokolit şiddetini öngörecektmenlerin incelenmesi. *Turk Ped Arş* 2006;2:95-9.
- 108.** Pourcyrous M, Korone SB, Yang W, Boulden TF, Bada HS. C-reactive protein in the diagnosis, management, and prognosis of neonatal necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* 2005; 116:1064-1069.
- 109.** Hall NJ, Peters M, Eaton S, Pierro A. Hyperglycemia is associated with increased morbidity and mortality rates in neonates with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2004;39:898-901.
- 110.** Molik KA, West KW, Rescorla FJ, Scherer LR, Engum SA, Grosfeld JL. Portal venous air: the poor prognosis persists. *J Pediatr Surg* 2001;36:1143-5.

- 111.** Hormann M, Pumberger W, Puig S, Kreuzer S, Metz V. Necrotizing enterocolitis NEC in the newborn. *Radiologe.* 2000;40:58-62.
- 112.** Jane S Lee, Richard A Polin. Treatment and prevention of necrotizing enteocolitis. *Seminars in Neonatology* 2003;8:449–59.
- 113.** Blakely ML, Tyson JE, Lally KP, McDonald S, Stoll BJ, Stevenson DK. Laparotomy versus peritoneal drainage for necrotizing enterocolitis or isolated intestinal perforation in extremely low birth weight infants: outcomes through 18 months adjusted age. *Pediatrics* 2006; 117(4):e680-87.
- 114.** Ricketts RR. Surgical treatment of necrotizing enterocolitis and the short bowel syndrome. *Clin Perinatol* 1994;21:365-87.
- 115.** Aliefendioğlu D. Nekrotizan Enterokolit. *Clinic Pediatri*:2010;5:48-60.
- 116.** Haller, M. F., Saltzman, W. M. Nerve growth factor delivery systems, *J. Control. Rel.*,53, 531-536 (1998).
- 117.** Konturec, R C, Konturecs. J, Brzozowski, T, Ernst. H. Epidermal Growth Factor and Transforming Growth Factor-alpha: Role in Protection and Healing of Gastric Mucosal Lesions, *Eur. J. Gastroenterot.Hepatol.* 7 (10) pp. 933-937, (1995).
- 118.** Clark J, Doelle S, Halpern M. Intestinal barrier failure during experimental necrotizing enterocolitis: protective effect of EGF treatment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006; 291: 938-949.
- 119.** Sullivan P, Brueton M, Taara Z. Epidermal growth factor in necrotizing enteritis. *Lancet* 145: 804-807,1991.
- 120.** Vogt PM, Lehnhardt M, Wagner D, Jansen V, Krieg M, Steinau HU. Determination of endogenous growth factors in human wound fluid: temporal presence and profiles of secretion. *Plast Reconstr Surg* 1998; 102: 117–123.
- 121.** Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet derived growth factor. *Physiol Rev* 1999; 79: 1283–1316.
- 122.** Okada-Ban, M., Thiery, J.P., Jouanneau, J. Fibroblast growth factor-2, *IJBCB*, 32, 263-267 (2000).
- 123.** Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407:242-8.

- 124.** Kleespies A, Guba M, Jauch KW, Bruns CJ. Vascular endothelial growth factor in esophageal cancer. *J Surg Oncol* 2004; 87:95-104.
- 125.** Ferrara N, Gerber HP, Le Couter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9:669-76.
- 126.** Tamanini C, De Ambrogi M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod Domest Anim* 2004; 39:206-16.
- 127.** Yazır Y, Gonca S, Filiz S, Dalçık H. Endotel hücreleri için önemli bir protein ailesi; VEGF, ailenin üyeleri, yapısı ve sentezi. *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 26 (4):181-184, 2004.
- 128.** Thomas KA. VEGF, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chemistry* 1996; 271:603-6.
- 129.** Bikfalvi A. Recent developments in the inhibition of angiogenesis: examples from studies on platelet factor-4 and the VEGF/VEGFR system. *Biochemical Pharmacology* 2004; 68:1017-21.
- 130.** Xin-Hua Feng. Cell, Genomics, and Molecular Surgery. In F. Charles Brunnicardi et al. *Schwartz's Manual Of Surgery* 8 th ed. ; 309.
- 131.** Catherine van Montfrans, Anje A. te Velde, Sander J. H. van Deventer, Maria Sol Rodriguez Pena. Gene therapy in the treatment of intestinal inflammation. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19:79-86.
- 132.** Ludwik K. Branski, Gerd G. Gauglitz. A review of gene and stem cell therapy in cutaneous wound healing. *Burns* 2009; 35:171-180
- 133.** Kevin R. Smith. Gene Therapy: Theoretical and Bioethical Concepts. *Archives of Medical Research* 2003;34: 247-268.
- 134.** Bank A. Human somatic gene therapy. *Bioessays* 1996;18: 999-1007.
- 135.** Koruda MJ, Rolandelli RH. Experimental studies on the healing of colonic anastomoses (review). *J Surg Res.* 1990; 48:504-515.
- 136.** Jiborn H, Ahonen J, Zederfeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses. I. Bursting strength of the colon after left colon resection and anastomosis. *Am J Surg* 1978;136:587-594.
- 137.** PaluÁ G, C. Parolin. Progress with retroviral gene vectors. *Rev. Med. Virol.* 2000; 10: 185-202.

- 138.** Wilhelm M. Reverse transcription of retroviruses and LTR Retrotransposons. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 2001;58: 1246–1262.
- 139.** T Roe, T C Reynolds, G Yu, and P O Brown. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J.* 1993 ; 12: 2099–2108.
- 140.** Daniel Klink, Dirk Schindelhauer. Gene delivery systems—gene therapy vectors for cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* 2004;3: 203– 212.
- 141.** Dragomira Majhen. Adenoviral vectors—How to use them in cancer gene therapy. *Virus Research* 2006;119:121–133.
- 142.** M.A. Witlox, M.L. Lamfers. Evolving gene therapy approaches for osteosarcoma using viral vectors: Review. *Bone* 2007;40:797–812..
- 143.** Martin Hauses, Hans K. Schackert. Gene therapy and gastrointestinal cancer: concepts and clinical facts. *Langenbeck’s Arch Surg* 1999; 384:479–488.
- 144.** Ceccarelli S, Cardinali G, Aspite N, Picardo M, Marchese C, Torrisi MR, Mancini P. Cortactin involvement in the keratinocyte growth factor and fibroblast growth factor 10 promotion of migration and cortical actin assembly in human keratinocytes. *Exp Cell Res* 2007; 313: 1758–1777.
- 145.** Crispin R. Dass. Lipoplex-mediated delivery of nucleic acids:factors affecting in vivo transfection. *J Mol Med* 2004; 82:579–591.
- 146.** Kruidener L., Kuiper I., Van Duijn W et al. Imbalanced Secondary Mucosal Antioxidant Response in Inflammatory Bowel Disease. *J Pathol* 2003; 201 (1): 17-27).
- 147.** Jonges L.E., Nagelkerka J.F., Ensink N.G. et al. Caspase-3 Activity as a Prognostic Factor in Colorectal Carcinoma. *Lab Invest.* 2001; 81: 681-688.)
- 148.** Barlow B, Santulli TV, Heird WC, Pitt J, Blanc WA, ve Schullinger JN. An experimental study of acut neonatal enterocolitis: The importance of breast milk. *J Pediatr Surg*, 1974; 9.587–595.
- 149.** Evan P Nadler, Dickinson E, Knisely A, Zhang XR, Boyle P, Beer-stolz D, Watkins SC, ve Ford HR. Expression of inducible nitric oxide synthase and interleukin–12 in experimental necrotizing enterocolitis. *J Surg Res*, 2000; 92.71–77
- 150.** Yurdakok B, Canpolat FE, Orhan D, Kale G.Indian Pediatr. Effects of enteral insulin on hypoxic changes in a rat model of necrotizing enterocolitis. 2010 Oct;47(10):887-8.

- 151.** Baregamian N, Mourot JM, Ballard AR, Evers BM, Chung DH. PPAR-gamma agonist protects against intestinal injury during necrotizing enterocolitis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Feb 6;379(2):423-7. Epub 2008 Dec 27.
- 152.** Spehlmann ME, Eckmann L. Nuclear factor-kappa B in intestinal protection and destruction. *Curr Opin Gastroenterol.* 2009 Mar;25(2):92-9. Review.
- 153.** Reginald V. N. Lord, MD Ji Min Park, MS Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor expression in esophageal adenocarcinoma and Barrett esophagus *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;125:246-53.
- 154.** Sullivan P, Lewindon P, Cheng C. Intestinal mucosal remodeling by recombinant human EGF in neonates with severe necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 42:462-469,2007.
- 155.** Warner B, Ryan A, Seeger K. Ontogeny of salivary epidermal growth factor and necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 150:358-363,2007.
- 156.** Shin CE, Falcone RA Jr, Stuart L. Diminished epidermal growth factor levels in infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 35:173-176,2000.
- 157.** Feng J, Besner G. Heparin-binding EGF like factor promotes enterocyte migration and proliferation in neonatal rats with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 42: 214-220,2007.
- 158.** Juul S, Yachnis A, Rojiana A. Tissue distribution of Epo and Epo-R in the developing human fetus. *Early Hum Dev* 52:235-249,1998.
- 159.** Maynard AA, Dvorak K, Khailova L, Dobrenen H, Arganbright KM, Halpern MD, Kurundkar AR, Maheshwari A, Dvorak B. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* Epidermal growth factor reduces autophagy in intestinal epithelium and in the rat model of necrotizing enterocolitis. 2010 Sep;299(3):G614-22. Epub 2010 Jun 10.
- 160.** Korpisalo P, Hytönen JP, Laitinen JT, Laidinen S, Parviainen H, Karvinen H, Siponen J, Marjomäki V, Vajanto I, Rissanen TT, Ylä-Herttuala S. *Eur Heart J.* Capillary enlargement, not sprouting angiogenesis, determines beneficial therapeutic effects and side effects of angiogenic gene therapy. 2010 Dec 7. [Epub ahead of print]
- 161.** Korpisalo P, Karvinen H, Rissanen TT, Kilpijoki J, Marjomäki V, Baluk P, McDonald DM, Cao Y, Eriksson U, Alitalo K, Ylä-Herttuala S. *Circ Res.* Vascular endothelial growth factor-A and platelet-derived growth factor-B combination gene

therapy prolongs angiogenic effects via recruitment of interstitial mononuclear cells and paracrine effects rather than improved pericyte coverage of angiogenic vessels. 2008 Nov 7;103(10):1092-9. Epub 2008 Oct 2.

162. Gaul J. Probiotics for the prevention of necrotizing enterocolitis. *Neonatal Netw.* 2008 Mar-Apr;27(2):75-80. Review.

163. Shah P, Shah V. Arginine supplementation for prevention of necrotising enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007 Jul 18;(3):CD004339.